

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA**



**EFEITO DA INCLUSÃO DA MICROALGA *NANNOCHLOROPSIS OCEANICA*  
NA DIETA DE BORREGOS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E QUALIDADE  
DA CARNE**

**ANA MÓNICA DE FIGUEIREDO GODINHO**

**ORIENTADOR:**

Doutor Rui José Branquinho de  
Bessa

**CO-ORIENTADORA:**

Doutora Susana Paula Almeida  
Alves

2020



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA**



**EFEITO DA INCLUSÃO DA MICROALGA *NANNOCHLOROPSIS OCEANICA*  
NA DIETA DE BORREGOS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E QUALIDADE  
DA CARNE**

**ANA MÓNICA DE FIGUEIREDO GODINHO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA/ PRODUÇÃO  
ANIMAL**

**JÚRI:**

**Presidente**

Doutor José Pedro da Costa  
Cardoso de Lemos

**Vogais**

Doutor Rui José Branquinho de  
Bessa

Doutor André Martinho de Almeida

**ORIENTADOR:**

Doutor Rui José Branquinho de  
Bessa

**CO-ORIENTADORA:**

Doutora Susana Paula Almeida  
Alves

2020

### Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Ana Mónica de Figueiredo Godinho

Título da Tese ou Dissertação: Efeito da inclusão da microalga *Nannochloropsis* oceânica na dieta de borregos no desempenho produtivo e qualidade da carne

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas):

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☒ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 29 de Janeiro de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Ana Godinho

## Agradecimentos

---

Agradeço a todos os que fizeram parte do meu percurso académico, aos que me incentivaram a dar mais de mim e a nunca desistir, aos que me apoiaram durante estes 5 anos e compreenderam o meu período de isolamento durante a conceção deste documento.

Aos meus orientadores: Professor Rui Bessa, pela confiança, e pela oportunidade de trabalhar num tema que se revelou desafiante, mas concretizador, pela forma descontraída como abordou aquele que é o culminar da minha formação académica e pelo apoio ao longo de todo o processo; e Professora Susana Alves pelo conhecimento partilhado, interesse e entusiasmo demonstrado pelo tema, e pela incansável disponibilidade desde o início do projeto. Um sincero obrigado.

Ao Engenheiro José Santos Silva e à Doutora Alexandra Francisco, por facilitarem a minha adaptação, pela companhia e sensibilidade, e pela ajuda e disponibilidade oferecida durante o período que passei longe de casa.

À Ana Cristina, pelo companheirismo e amizade, pela prontidão em ajudar com qualquer coisa que precisasse, e pelo papel fundamental que teve na minha integração e melhor compreensão do tema.

Agradeço também a toda a equipa técnica do INIAV-Santarém, integrante do projeto, que de alguma forma contribuiu para a realização deste ensaio, desde a fase de maneio, até ao abate dos animais. Sem o apoio deste conjunto de pessoas, o meu trajeto teria sido, com certeza, mais espinhoso e complicado.

Aos meus colegas e amigos, com quem partilhei experiências, conhecimento e um crescente interesse por esta atividade, aqueles com quem partilhei os melhores anos de faculdade e que fizeram os dias e noites de trabalho menos pesados, pelo conhecimento partilhado, companheirismo e apoio. Agradeço em particular à Daniela, ao Miguel, à Leonor e à Laura, sem eles, toda a minha experiência enquanto estudante académica seria indubitavelmente mais vazia.

À minha Avó pela confiança depositada em mim, por nunca duvidar e acreditar sempre naquilo que sou capaz, à minha Mãe por tornar possível, por fazer tudo para satisfazer o meu (e seu) desejo de me formar academicamente (a primeira na família), os seus ensinamentos e noções de responsabilidade revelaram-se valiosos durante todo o meu percurso académico. Às duas, espero dar-vos orgulho.

Agradeço ainda ao meu pai e à Joana, pela preocupação e interesse constante e pela vontade de me ver prosperar, relativizando sempre qualquer adversidade que me

surgisse no caminho, e ao meu irmão, pela descontração e naturalidade com que me ajudou sempre que precisei dele, obrigado mano.

Por fim, agradeço ao Pedro, que não podia ter entrado na minha vida em melhor altura, só ele sabe verdadeiramente tudo o que passei. Por encontrar sempre tempo para me ajudar, pela paciência interminável para me aturar, pelo apoio e incentivo constantes, por não me deixar esmorecer, pela sua capacidade de me fazer ver os obstáculos de uma forma mais simples e positiva, por procurar uma solução para os meus problemas, mesmo quando se parecem ter esgotado todas as alternativas, e sobretudo, por nunca me ter falhado quando precisei dele. Sem ele não teria chegado onde cheguei hoje. Obrigada Pê!

## Resumo

---

A carne de ruminantes é caracterizada por ser pobre em ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e rica em ácidos gordos saturados (SFA), devido ao processo de bioidrogenação (BH) que ocorre no rúmen. É recomendado pelas organizações mundiais de saúde que a população diminua o seu consumo em SFA e aumente o teor em PUFA, sendo altamente recomendável o aumento de PUFA ómega 3 de cadeia longa (*n*-3 LC-PUFA), nomeadamente o ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). Uma das estratégias para alterar o perfil lipídico da carne é recorrendo à manipulação da alimentação animal com a inclusão de EPA e DHA, provenientes, essencialmente de fontes marinhas, como o óleo de peixe e microalgas. A hipótese colocada neste trabalho corresponde a averiguar se a introdução de microalgas, na forma de biomassa desidratada, na dieta de ruminantes, poderá proteger naturalmente os LC-PUFA dos microrganismos do rúmen melhorando, desta forma o perfil lipídico da carne. Assim sendo, foi realizado um ensaio no INIAV-Santarém, com a duração de três semanas; o qual contou com 28 borregos de raça Merino Branco (MB) distribuídos aleatoriamente por 4 dietas diferentes (Controlo (C) e dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis* spp (O); 9,2% de *Nannochloropsis oceanica* liofilizada (L); e 12,3% de *N. oceanica* spray dried (S)). Cada quantidade de microalgas foi adicionada para a dieta conter quantidades idênticas de EPA (3 g/kg de matéria seca). Neste ensaio testou-se a viabilidade da *N. oceanica* como uma via de proteção do EPA não só no rúmen, mas também no restante caminho até ao duodeno do animal, onde poderá ser absorvido e depositado nos seus tecidos sem afetar o desempenho produtivo dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que a incorporação da biomassa da *N. oceanica* na dieta dos borregos aumentou os níveis de *n*-3 LC-PUFA, maioritariamente o EPA, na carne, não havendo diferenças significativas entre as dietas com os diferentes métodos de secagem. Estes resultados foram obtidos sem afetar tanto o desempenho produtivo dos borregos como as características qualitativas da carne. A biomassa de *N. oceanica* é, assim, uma potencial fonte protetora de EPA quando incorporada na alimentação de borregos.

**Palavras chave:** *Nannochloropsis oceanica*, EPA, *n*-3 LC-PUFA, bioidrogenação, borregos

## Abstract

---

Ruminant meat is characterized by its low polyunsaturated fatty acid (PUFA) content and high saturated fatty acid (SFA) content, due to the biohydrogenation process (BH) which occurs in the rumen. It is recommended by world health organizations that population should decrease the consumption of SFA and increase the PUFA consumption, being highly recommended a significant increase in omega 3 long chain PUFA (*n*-3 LC-PUFA), mainly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). One of the best ways to modify the fatty acid profile in meat is through manipulation of animal feeding, through inclusion of EPA and DHA, which come mostly from fish oil and microalgae. It was hypothesized that the introduction of microalgae in dehydrated biomass form in the ruminant diet might naturally protect the LC-PUFA from rumen microorganisms, and thus improve the lipid profile of meat. Therefore, a three-week trial was performed in INIAV-Santarém, with 28 Merino Branco (MB) lambs, in which each seven were randomly subjected to 4 different diets (Control (C) and C supplemented with 1,2% of *Nannochloropsis* spp. oil extract (O); 9,2% of *Nannochloropsis oceanica* freeze-dried (L); and 12,3% of *N. oceanica* spray dried (S)). Each portion of microalgae was added to contain equal amounts of EPA (3 g/kg dry matter) in diet. In this study, we tested the viability of *N. oceanica* as a natural source of rumen-protected EPA, not only in the rumen but also in the remaining pathway to the lamb's duodenum to be absorbed and deposited in its tissues without compromise the animal performance and their productive characteristics. The incorporation of *N. oceanica* biomass increased the levels of *n*-3 LC-PUFA, mainly EPA, in lamb meat and there were no significant differences between diets with different drying methods. These results were obtained without affecting both lamb productive performance as well as meat qualitative characteristics. The *N. oceanica* biomass shows a strong potential to be used as natural dietary source of EPA to lambs.

**Keywords:** *Nannochloropsis oceanica*, EPA, *n*-3 LC-PUFA, biohydrogenation, lambs



## Índice

---

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>2</b>
1.1. Produção e consumo de carne de borrego e efeitos na saúde humana.....	2
1.1.1. Produção e consumo mundial e nacional .....	2
1.1.2. Composição química da carne .....	4
1.1.3. Ácidos gordos na carne .....	4
1.1.4. Ácidos gordos e qualidade sensorial na carne .....	6
1.1.5. Ácidos gordos e efeitos na saúde humana .....	8
1.2. Metabolismo dos ácidos gordos .....	9
1.2.1. Digestão lipídica .....	10
1.2.1.1. Biohidrogenação dos ácidos oleico, linoleico e linólenico .....	12
1.2.1.2. Biohidrogenação dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa .....	15
1.2.4. Absorção lipídica e transporte até aos tecidos .....	15
1.2.5. Deposição nos tecidos .....	16
1.3. Fontes lipídicas na dieta de ruminantes .....	17
1.3.1. Suplementação lipídica na dieta de borregos .....	18
1.3.2. Microalgas como suplemento lipídico .....	18
1.3.2.1. Microalgas na alimentação de pequenos ruminantes .....	19
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>23</b>
2.1. Materiais e métodos.....	23
2.1.1. Maneio dos animais e abate .....	23
2.1.2. Análise Sensorial .....	25
2.1.3. Análises Laboratoriais .....	25
2.1.3.1. Extração de lípidos .....	25
2.1.3.2. Transesterificação combinada.....	26
2.1.3.3. Análise por cromatografia gasosa .....	27
2.1.4. Análise Estatística .....	27

<b>2.2.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
2.2.1.	Desempenho produtivo .....	28
2.2.2.	Cor e Análise Sensorial .....	29
2.2.3.	Composição em ácidos gordos.....	30
<b>2.3.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>34</b>
2.3.1.	Desempenho produtivo .....	34
2.3.2.	Cor e Análise Sensorial .....	35
2.3.3.	Composição em ácidos gordos.....	36
<b>3.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>ANEXO I .....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXO II .....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXO III .....</b>	<b>48</b>

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Evolução da produção de carne de ovino em cada continente, do ano 2000 ao ano 2017 (Fonte: FAOSTAT 2019).....	2
<b>Figura 2.</b> Evolução do efetivo ovino em Portugal do ano 2000 ao ano 2017 (Fonte: FAOSTAT 2019).....	3
<b>Figura 3.</b> Representação ilustrativa dos quatro compartimentos do estomago de um ruminante (adaptado de McDonald et al. 2010).....	10
<b>Figura 4.</b> Principais vias da bioidrogenação do ácido oleico (adaptado de Jenkins et al. 2006).....	12
<b>Figura 5.</b> Bioidrogenação simplificada do ácido linoleico (adaptado de Kramer et al. 2004). .....	13
<b>Figura 6.</b> Principais vias da bioidrogenação do ácido linolénico (adaptado de Alves et al. 2014; Griinari et al. 1999). ....	14

## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Composição química (% de MS) e composição em ácidos gordos (g/100g) presentes nas diferentes dietas administradas aos animais. ....	24
<b>Tabela 2.</b> Consumo, crescimento e características da carcaça de borregos alimentados com diferentes dietas. ....	28
<b>Tabela 3.</b> Avaliação da cor da carne (músculo longissimus dorsi) e da gordura subcutânea de borregos alimentados com diferentes dietas.....	29
<b>Tabela 4.</b> Classificação das diferentes características sensoriais, por um painel de provadores, da carne de borregos alimentados com diferentes dietas. ....	30
<b>Tabela 5.</b> Concentração de Lípidos Totais (LT) em mg/g de MS de carne, ácidos gordos totais (AGT) em mg/g de MS de carne e a composição em ácidos gordos em % do total de ácidos gordos presentes na carne de borregos alimentados com diferentes dietas. ....	30
<b>Tabela 6.</b> Total de AG n-3, n-6, trans -18:1 e BI presentes nas amostras de carne analisadas provenientes de borregos alimentados com diferentes dietas. ....	33
<b>Tabela 7.</b> Composição da dieta base (Controlo) utilizada na mistura com as diferentes fontes de EPA.....	46

## Lista de abreviaturas

---

AG – Ácidos gordos

AGE – Ácidos gordos essenciais

AGV – Ácidos gordos voláteis

ALA –  $\alpha$ -linolénico ou ácido linolénico (18:3 $n$ -3 ou 18:3 c9c12c15)

ARA – Ácido araquidónico (20:4 $n$ -6)

BH – Biohidrogenação

BI – Intermediários da biohidrogenação

CLA - Isómeros conjugados do ácido linoleico (Conjugated Linoleic Acids)

DHA - Ácido docosahexaenóico (22:6 $n$ -3)

DPA – Ácido docosapentaenóico (22:5 $n$ -3)

EPA – Ácido eicosapentaenóico (20:5 $n$ -3)

LA – Ácido linoleico (18:2 $n$ -6 ou 18:2 c9c12)

LC-PUFA – Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados

$n$ -3 LC-PUFA – Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ómega-3

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados

SFA – Ácidos gordos saturados

TG – Triacilgliceróis

UFA – Ácidos gordos insaturados

## Introdução

---

O perfil dos consumidores tem vindo a mudar ao longo dos anos e tem-se vindo a registar uma crescente preocupação e sensibilidade sobre a qualidade nutricional dos alimentos, nomeadamente da carne e a sua composição lipídica. A carne proveniente de animais ruminantes é rica em ácidos gordos saturados (SFA) e pobre em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), o que poderá contribuir para o aumento de doenças metabólicas e cardiovasculares. Por outro lado, a carne é um alimento preponderante visto que providencia energia e contém ácidos gordos essenciais (AGE) que devem fazer parte da nossa alimentação diária. Como tal, é necessário encontrar uma forma de alterar esse perfil lipídico sendo que uma das vias para garantir isso passa, incontornavelmente, pela manipulação da dieta do animal.

Nos últimos anos têm sido levadas a cabo diversas investigações que visam avaliar o potencial das fontes de PUFA de origem marinha (como o EPA e o DHA), revelando as mesmas, propriedades benéficas para a saúde humana. As fontes alternativas de EPA e DHA possíveis de serem utilizadas na alimentação animal correspondem aos óleos de peixe e às algas marinhas tendo sido registados casos de sucesso em monogástricos, sendo que no que toca a ruminantes, derivado da biohidrogenação (BH) que ocorre no rúmen, a situação não se revela tão simples. A grande maioria destes AGE são hidrogenados, gerando SFA e uma grande quantidade de ácidos gordos (AG) intermediários, impedindo que os AGE escapem do rúmen e possam ser absorvidos e depositados nos tecidos do animal.

Têm sido feitos diversos estudos visando a proteção dos PUFA de cadeia longa ómega 3 (*n*-3 LC-PUFA) da população microbiana de modo a aumentar a quantidade destes PUFA disponível para a deposição no músculo e tecido adiposo. É a partir deste princípio que surge a hipótese do uso de microalgas como uma fonte natural de *n*-3 LC-PUFA, nomeadamente EPA, que poderá proteger esses AG da BH. Este facto poderá aumentar os níveis de PUFA na carne contribuindo para uma melhor saúde do consumidor. O potencial da microalga *Nannochloropsis oceanica* como uma fonte natural e protetora de EPA para ruminantes foi testado *in vitro*, tendo sido registados resultados positivos e bastante promissores. Desta forma, a próxima fase de investigação passa então por testar *in vivo*.

### 1.1. Produção e consumo de carne de borrego e efeitos na saúde humana

#### 1.1.1. Produção e consumo mundial e nacional

Os ovinos são uma espécie com alta capacidade de adaptação ao clima, topografia e condições de alimentação adversas. Correspondem a uma espécie de aptidão múltipla, para a produção de leite, de carne e lã (Sañudo et al. 1998). Em 2017 o efetivo ovino mundial foi, aproximadamente, 1202 milhões de animais, sendo a Ásia o principal produtor com uma representatividade de 42% do efetivo mundial (FAOSTAT 2019). Por muitos anos a União Europeia (EU) liderou a produção e comércio de carne de ovinos e caprinos no mundo, no entanto, a partir do ano 1992, a China tomou esse lugar permanecendo até aos dias de hoje (SAC et al. 2000). Atualmente, na Ásia (e à escala global), a China é o país que domina o mercado da produção de carne ovina (Figura 1) assim como o mercado de importação da mesma. Já na Oceânia, a Austrália e a Nova Zelândia são, a seguir à China, os principais produtores desta carne, no entanto, são os principais exportadores a nível mundial. De seguida, os países com maior produção de carne ovina são o Sudão (África) e a Turquia (Europa/Ásia) e como sexto maior produtor de carne (e maior, em termos europeus) temos o Reino Unido (Colby et al. 2016).

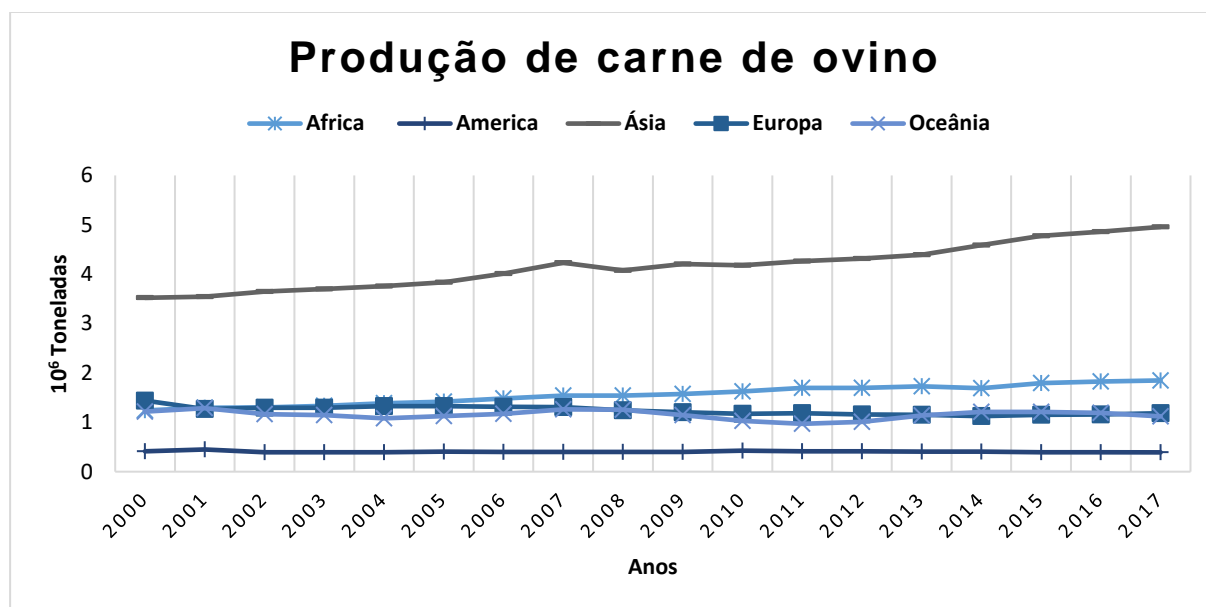
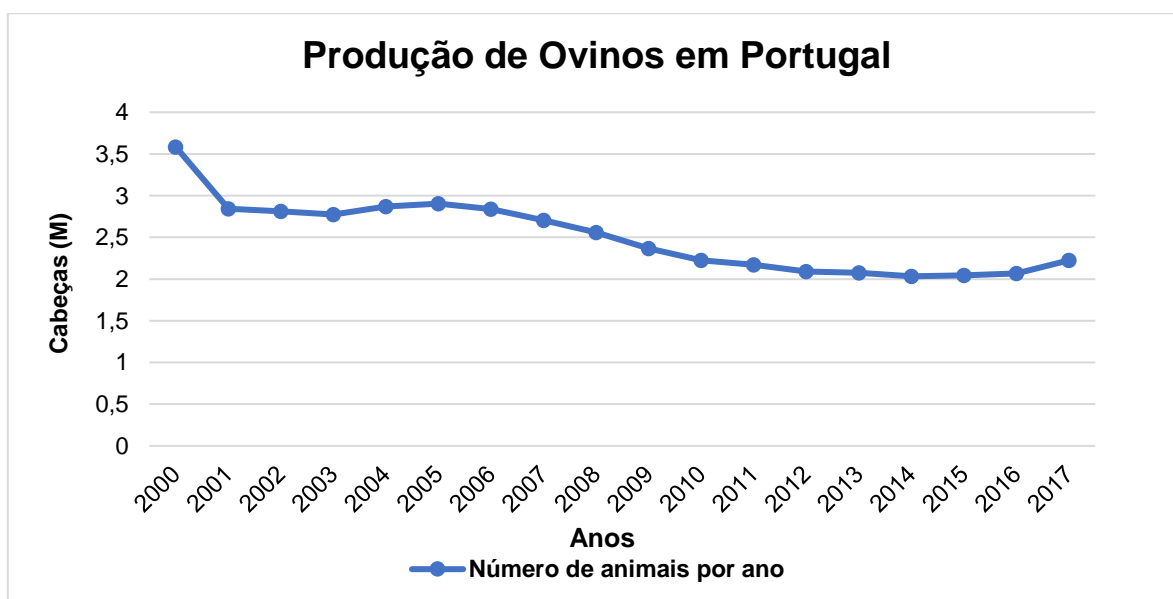


Figura 1. Evolução da produção de carne de ovino em cada continente, do ano 2000 ao ano 2017 (Fonte: FAOSTAT 2019).

Quando se fala em carne de ovino estão implícitos dois tipos de carne: o borrego e o *mutton*, carne de ovino adulto. A carne de borrego é dominante em países mais desenvolvidos enquanto que o *mutton* tem uma grande importância na cultura muçulmana e em países onde os consumidores têm menor poder financeiro. A carne de ovino ainda é vista como uma carne tradicional com um papel limitado na cozinha moderna sendo que o seu consumo varia bastante em todo o mundo sobretudo devido a fatores culturais, económicos, sociais e geográficos (Locke and O'Connor 2017). Os maiores consumidores de carne de ovino são a China, o Reino Unido, o Sudão, países do Médio Oriente, África e alguns países da União Europeia, dispostos em ordem decrescente (Colby et al. 2016). Países como o Reino Unido, França, Espanha e Portugal registam um consumo acima da média na época da Páscoa (Locke e O'Connor 2017). Geay (2001) afirma que em França, de 31 kg de carcaça de ruminantes consumida por pessoa por ano, 5 kg equivalem a carne de ovino e caprino e 26 kg equivalem a carne bovina. O consumo deste tipo de carnes tem tendência a decrescer cada vez mais devido à competição pelas carnes brancas cujo preço é comparativamente mais baixo. Outra razão para o decréscimo do consumo deste tipo de carne é a própria decisão do consumidor (que muitas vezes é influenciada por notícias e publicações na comunicação social que induzem a população em erro). O mesmo se tem observado no resto da Europa e Estados Unidos (Geay et al. 2001).

Em Portugal, o efetivo de ovinos tem vindo a decrescer, embora nos últimos dois anos tenha havido um ligeiro aumento (Figura 2). O efetivo nacional de ovinos em 2017 foi pouco mais de 2 milhões de cabeças de acordo com a FAOSTAT e a quantidade de carne produzida foi de aproximadamente 16 mil toneladas (FAOSTAT 2019).



**Figura 2. Evolução do efetivo ovino em Portugal do ano 2000 ao ano 2017 (Fonte: FAOSTAT 2019).**



Este cenário resultou do menor número de borregos levados ao abate, facto justificado, em parte, pelo aumento das exportações de animais vivos e por um nível de produtividade inferior, resultante das condições de seca em 2017 (INE 2017). Em Portugal existem duas fortes épocas de forte consumo de borrego, sendo elas a Páscoa (como referido anteriormente) e o Natal. Facto este justificado pelo consumo de carne de pequenos ruminantes ser tão baixo comparativamente com outras espécies como os bovinos, suínos ou aves que são consumidas regularmente durante todo o ano, para não falar da competição que existe entre elas a nível económico.

### **1.1.2. Composição química da carne**

Os principais benefícios associados ao consumo de carnes vermelhas, estão relacionados com a sua composição nutricional. Este tipo de carne contém alto valor nutritivo contribuindo para uma alimentação saudável (Williamson et al. 2005), como é o exemplo da –carne proveniente de ruminantes, sendo esta uma importante fonte de nutrientes essenciais tais como ferro, zinco e vitaminas do grupo B (Geay et al. 2001). Esta é também uma fonte mais eficiente que a comida de origem vegetal no que toca ao fornecimento de aminoácidos essenciais (Williamson et al. 2005). Este tipo de carne, quando consumida em quantidades moderadas, pode ser também uma importante fonte de ácidos gordos (AG) como isómeros conjugados do ácido linoleico (CLA) e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (*n*-3 PUFA), com efeitos benéficos para a saúde (Bessa et al. 2015).

A proteína é necessária na dieta para o crescimento, manutenção e reparação do corpo humano e pode também providenciar energia, tal como a gordura. A gordura é a fonte dietética mais rica em energia e fornece nutrientes essenciais como vitaminas lipossolúveis e AGE (Williamson et al. 2005). A natureza e a quantidade de lípidos armazenados no músculo do animal dependem essencialmente das condições em que são alimentados, da sua digestão, absorção intestinal, metabolismo hepático e do sistema de transporte até ao musculo (Geay et al. 2001).

### **1.1.3. Ácidos gordos na carne**

A gordura presente na carne de ruminantes é constituída por diferentes tipos de AG: ácidos gordos saturados (SFA) e ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), sendo que estes existem em maior quantidade e em menor quantidade os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (Williamson et al. 2005; Wood et al. 2007). Os principais SFA presentes na carne vermelha são o ácido palmítico (16:0) e esteárico (18:0); o principal MUFA é o ácido oleico

(18:1 *c*9) sendo este o que se encontra em maior quantidade na carne (Wood et al. 2007); os principais PUFA, por sua vez, são os ácidos linoleico (LA ou 18:2*n*-6), araquidónico (ARA ou 20:4*n*-6) e  $\alpha$ -linolénico (ALA ou 18:3*n*-3). O LA e ALA são AGE, por serem indispensáveis e não poderem ser sintetizados no corpo do animal (Williamson et al. 2005). A carne também contém poucas quantidades de ácidos gordos polinsaturados ómega 3 de cadeia longa (*n*-3 LC-PUFA) como os ácidos eicosapentaenóico (EPA ou 20:5*n*-3), docosapentaenóico (DPA ou 22:5*n*-3) e docosahexaenóico (DHA ou 22:6*n*-3) (Williamson et al. 2005). Está também contido na carne de ruminantes um grupo importante de AG, os chamados ácidos conjugados do ácido linoleico (CLA) que têm mostrado ter um papel benéfico para os consumidores de carne (Wood et al. 2007; Jenkins et al. 2008).

O perfil lipídico da carne de ruminantes não é particularmente saudável, nomeadamente devido às grandes concentrações em SFA, baixas concentrações de *n*-3 PUFA e ainda a uma concentração, ainda que variável, de AG *trans* (Bessa et al. 2015), por efeito dos processos que ocorrem no rúmen durante a digestão. Os SFA na carne podem ser de diversas origens, isto é, podem derivar diretamente da dieta, podem ser produzidos no rúmen a partir de ácidos gordos insaturados (UFA) da dieta, ou sintetizados *de novo* a partir da glucose ou acetato livres no tecido adiposo (Wood et al. 2007). Os MUFA são normalmente formados no tecido adiposo a partir dos SFA pela ação de enzimas dessaturase como é o exemplo a  $\Delta$ -9-dessaturase que forma 18:1 *c*9 a partir de 18:0 (Wood et al. 2007). Este mesmo complexo de enzimas origina o ácido ruménico (CLAc9*t*11) a partir do ácido vacénico (ou 18:1 *t*11, um produto da biohidrogenação (BH)) formando-se maioritariamente no tecido adiposo, mas também, embora em menor quantidade, no rúmen (Wood et al. 2007). Os PUFA podem ser do tipo *n*-6 e *n*-3. O *n*-6 PUFA mais abundante é o LA e pode servir de precursor, através de enzimas dessaturases e elongases, ao ARA (Wood et al. 2007). O *n*-3 PUFA mais comum é o ALA (Wood et al. 2007) e é um precursor da síntese de *n*-3 LC-PUFA como o EPA e DHA, (Lee e Jenkins 2011). É sugerido que o ALA seja o substrato favorito quando falamos na sua dessaturação e elongação nos tecidos do animal, no entanto, a presença de uma grande quantidade de LA normalmente resulta numa melhor síntese e deposição de LC-PUFA *n*-6 (Wood et al. 2007). A conversão em EPA e DHA é então pouco eficiente derivado da competição existente pelas mesmas enzimas de dessaturação e elongação necessárias para o LA (FAO 2010), que se encontra em maior quantidade na alimentação, o que normalmente resulta num rácio *n*-6/*n*-3 elevado e prejudicial à saúde. Os LC-PUFA mais abundantes nos tecidos dos ruminantes são, por ordem decrescente, o ARA, DPA e EPA (Wood et al. 2007).

Na carne de ovino a quantidade de gordura intramuscular é de 30 a 80 g/kg e a composição em AG é de 450 a 480 g/kg de SFA, 350 a 450 g/kg de MUFA e até 50 g/kg de

PUFA (Scollan et al. 2017). Os AG na gordura intramuscular da carne, podem-se encontrar em duas classes principais de lípidos: os lípidos neutros, (principalmente sob a forma de triacilgliceróis (TG) e armazenados nos adipócitos localizados ao longo das fibras musculares) e os lípidos polares (sob a forma de fosfolípidos como componentes estruturais das membranas) (Wood et al. 2007; De Smet et al. 2004). Os lípidos neutros são os principais componentes lipídicos do tecido adiposo (>90%) em animais considerados maduros, já os lípidos polares, por sua vez contribuem com 10% dos AG totais presentes no músculo (Wood et al. 2007). Os fosfolípidos têm uma concentração mais elevada de PUFA quando comparados com os TG e dado que os animais que falamos, são animais em crescimento (alimentados à base de concentrados que se reflete numa maior quantidade de TG), depositam elevadas quantidades de gordura intra e intermuscular, o que resulta numa maior proporção de lípidos neutros comparativamente aos lípidos polares, produzindo assim uma menor quantidade de PUFA nos lípidos totais (Wood et al. 2007).

#### **1.1.4. Ácidos gordos e qualidade sensorial na carne**

O teor lipídico da carne varia conforme o tipo de músculo e tecido, espécie animal e sistema de produção, influenciando também as propriedades nutricionais, sensoriais, bem como tecnológicas e qualitativas da mesma (Scollan et al. 2006; Wood et al. 2007). Além disso, os AG presentes na carne determinam as propriedades físicas e texturais do tecido adiposo e a estabilidade de oxidação do músculo, o que afeta a cor, a tenrura, a suculência, o *flavour* e todo o gosto geral da carne (Scollan et al. 2017). A satisfação que o consumidor sentirá ao comer a carne que compra só é atingida verdadeiramente quando consumida, conseguindo avaliar as características qualitativas como a tenrura, suculência e *flavour* (Troy e Kerry 2010), no entanto, a cor da carne é a primeira característica que avalia e muitas das vezes, a única que o faz escolher a carne no momento da compra (Lebret e Picard 2015). No caso da carne de borrego, o consumidor exige e espera encontrar uma cor vermelha brilhante (Calnan et al. 2016), indicando frescura e salubridade ao produto (Troy e Kerry 2010). Ainda relativamente à cor, existe outro fator visual que pode afetar a escolha do produto: a presença e extensão do marmoreado (Troy e Kerry 2010). A gordura intramuscular que produz este marmoreado afeta o *flavour*, a suculência, a tenrura e a cor, no entanto, sabe-se que um aumento deste marmoreado na carne significa um aumento da sua palatibilidade (Troy e Kerry 2010). A cor do tecido adiposo pode variar entre os tons branco e amarelo alaranjado, variação essa que está ligada ao tipo de dieta que é fornecida ao animal (forragem vs. concentrados) e à capacidade que o organismo do animal tem para converter esses compostos lipossolúveis noutros compostos quase incolores (Troy e Kerry

2010). Apesar da cor amarelada não afetar a qualidade do produto, é considerada indesejável por consumidores que a associam, erradamente a animais doentes, velhos ou subnutridos (Troy e Kerry 2010). Normalmente a cor é medida por um colorímetro e utiliza-se o sistema CIE (Hunt et al. 2012), que contém três coordenadas fundamentais  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , onde  $L^*$  mede a luminosidade, avaliando a luz refletida (luminosidade),  $a^*$  mede o vermelho (valores positivos) e o verde (valores negativos) e  $b^*$  mede o amarelo (valores positivos) e azul (valores negativos) (Hunt et al. 2012).

A tenrura é a facilidade com que a carne é cortada e mastigada e é um dos fatores mais importantes na qualidade sensorial da carne (Lebret e Picard 2015). Segundo Wood et al. (2003), o efeito de tenrura da carne parece dever-se mais à quantidade de lípidos e quantidade total de AG, do que à presença de determinado AG.

A percepção do *flavour* envolve o paladar e o olfato simultaneamente através de um conjunto complexo de sensações formadas por sabores detetados pelas papilas gustativas da língua e aromas detetados retro-nasalmente quando o produto se encontra já dentro da boca (Lebret e Picard 2015). O efeito dos AG no *flavour* da carne deve-se, sobretudo, à produção de compostos voláteis e odoríferos que, por sua vez, resultam da oxidação térmica dos lípidos quando cozinhados, e do envolvimento destes com produtos da reação de *Maillard* gerando outros compostos voláteis que contribuem para o *flavour* e odor da carne, sendo os UFA dos fosfolípidos particularmente importantes no desenvolvimento de *flavours* (Wood et al. 2003). Posto isto, estratégias com o objetivo de alterar o perfil lipídico da carne podem alterar consequentemente o tipo de compostos voláteis produzidos alterando assim o seu aroma e *flavour*.

A suculência da carne avalia o nível de “secura” (Lebret e Picard 2015). Distinguimos a suculência inicial, a que se percebe na primeira mordida e está relacionada com a quantidade de água libertada durante a mastigação e, nas mordidas posteriores, a suculência que permanece durante a mastigação, que é, por sua vez, a que estimula a salivação devido à presença dos lípidos (Lebret e Picard 2015). Um fator essencial que influencia a suculência é a capacidade de retenção de água do músculo e o pH. Uma carne com pH baixo tem tendência a perder água, por isso, uma carne com alto pH terá uma retenção de água e apresentará uma suculência superior (Lebret e Picard 2015). Assim sendo, a suculência (bem como o *flavour*) está diretamente relacionada com a capacidade de retenção de água e com o teor em gordura intramuscular da carne (Hocquette et al. 2010).

### 1.1.5. Ácidos gordos e efeitos na saúde humana

Apesar de terem sido estabelecidos limites nutricionais, algumas pesquisas indicam que a ingestão de SFA por norma excede os níveis recomendados enquanto que, relativamente ao consumo de PUFA, mais propriamente *n*-3 PUFA, os níveis de consumo estão abaixo daquilo que é considerado ideal (Scollan et al. 2017; FAO 2010). O rácio *n*-6/*n*-3 é considerado um fator de risco no que toca ao cancro e a doenças cardíacas coronárias, nomeadamente na formação de coágulos sanguíneos, o que leva, muitas vezes, à ocorrência de ataques cardíacos (Wood et al. 2003), sendo por isso recomendado que o valor de *n*-6/*n*-3 seja menor que 4.0 (Wood et al. 2003). No entanto, considera-se que os efeitos negativos na saúde associados a um elevado rácio de *n*-6/*n*-3 podem dever-se a uma menor ingestão de *n*-3 PUFA, uma vez que ainda não se encontra esclarecido que a ingestão de *n*-6 PUFA representa um risco para a saúde humana, levando assim, a acreditar que aquilo que realmente importa são as ingestões absolutas de cada AG e não a relação existente entre eles (FAO 2010).

A maioria dos PUFAS consumidos na dieta humana provêm de óleos e gorduras vegetais que contêm altos teores de LA e ALA, no entanto, quando se fala sobre consumos de *n*-3 LC-PUFA como o EPA e o DHA, os valores ficam aquém do que é recomendado pela *European Food Safety Authority*, que propôs um valor “adequado” do consumo do somatório de EPA e DHA de 250 mg/dia para um adulto (Givens 2015). Espaço para destacar que estes dois últimos AG são recomendados devido aos efeitos benéficos que têm para a saúde humana, pois providenciam efeitos anti-aterogénicos, anti-trombóticos e anti-inflamatórios estando cientificamente provado que o aumento da ingestão dos mesmos leva à diminuição da incidência de doenças cardiovasculares (Givens 2015; Robinson e Stone 2006).

A maior fonte de *n*-3 LC-PUFA frequentemente presente na alimentação humana é o marisco e o peixe “gordo” (salmão, salmonete e cavalinha) e o óleo de peixe (Adarme-Vega et al. 2012; Martins et al. 2013). No entanto, devido à cultura, preferências individuais, conveniências, localização geográfica ou avisos de riscos associados ao consumo de “peixe gordo”, o consumo desse tipo de peixe está longe de conseguir suprir os níveis de dietas recomendados (Martins et al. 2013). É necessário explorar novas alternativas que contenham esses AGE (Martins et al. 2013), não só pelas reservas globais de peixe estarem a diminuir devido aos métodos de pesca e sobrepesca mas também por estes óleos utilizados como suplemento estarem contaminados com metais pesados e toxinas originando por vezes um cheiro muito característico, sabor desagradável e baixa estabilidade oxidativa (Adarme-Vega et al. 2012; Gouveia et al. 2008).

Nutricionalmente, o EPA e o DHA são os AG mais importantes dentro da família dos *n*-3 LC-PUFA, providenciando vários benefícios na população humana, principalmente diminuindo o risco de incidência de doenças cardíacas como arritmias, ataques cardíacos ou pressão sanguínea elevada e, mais recentemente, reconheceu-se que evitam ainda depressões, arterites reumáticas e asma (Adarme-Veja et al. 2012). Para além destes dois AG, existem também os CLA, presentes nos produtos originados pelos ruminantes, e que têm mostrado em alguns estudos com animais a contribuição para a prevenção do cancro, para a diminuição de aterosclerose, para o aumento da resposta imunitária e alterações no metabolismo proteico e energético (Jenkins et al. 2008). Contudo, embora os CLA sejam desejáveis por terem efeitos benéficos na saúde como já referido anteriormente, poderá ocorrer uma mudança na BH que leva ao caminho indesejável do *shiftrans*-10, que contribui para consequências negativas na saúde humana (Aldai et al. 2013). Este *shiftrans*-10 é conhecido como sendo a acumulação de 18:1 $\omega$ 10, um dos principais AG *trans* formados no rúmen (Aldai et al. 2013).

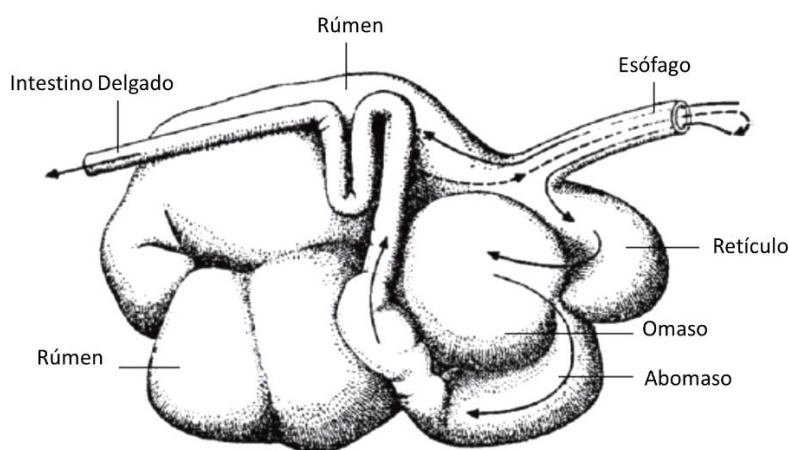
De forma a enriquecer a carne em *n*-3 LC-PUFA, a estratégia base é aumentar o nível de ingestão de *n*-3 PUFA nos ruminantes, no entanto, esta encontra-se limitada pela: (i) extensa BH no rúmen dos *n*-3 PUFA; (ii) baixa conversão endógena do ALA em *n*-3 LC-PUFA; e (iii) capacidade do musculo para incorporar e armazenar *n*-3 LC-PUFA (Bessa et al. 2015). Estas variações no organismo do animal fazem com que se produzam vários produtos durante a BH sendo que alguns são absorvidos no intestino delgado e incorporados nos lípidos dos tecidos, dando origem a um produto com elevados níveis de SFA e baixos níveis de PUFA.

## **1.2. Metabolismo dos ácidos gordos**

Os ruminantes são herbívoros e a sua alimentação é composta sobretudo por plantas forrageiras e fibrosas cuja constituição se baseia maioritariamente em polissacáridos (como a celulose), que não podem ser decompostos por enzimas digestivas presentes nos mamíferos (McDonald et al. 2010). Por esta mesma razão, estes animais desenvolveram um sistema de digestão com uma elevada capacidade de fermentação obtida a partir de comunidade microbiana anaeróbia presente no seu trato digestivo e com a qual mantêm uma relação de simbiose. Esta característica permite a extração de energia das paredes vegetais e de nutrientes de determinados alimentos (Bessa 2019) com a ajuda de enzimas de origem microbiana. O estômago destes animais é dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso (Figura 3). Os primeiros três compartimentos

mencionados são responsáveis pela pré-digestão submetendo os alimentos a um longo período de fermentação pela ação microbiana. No quarto e último compartimento atuam enzimas digestivas e ocorrem funções semelhantes às do estômago de um monogástrico. O baixo nível de pH da região do abomaso é responsável pela morte das bactérias e pela morte e desintegração dos protozoários que entram nesse compartimento. E providencia também condições ótimas para a atividade de enzimas pépticas responsáveis pela digestão de proteínas microbianas (Harfoot 1981a).

A fisiologia destes animais dá-lhes a capacidade de que aproveitem ao máximo a energia extraída das componentes fibrosas presentes na dieta sendo que só com a presença de enzimas tal não seria possível.



**Figura 3. Representação ilustrativa dos quatro compartimentos do estômago de um ruminante (adaptado de McDonald et al. 2010)**

### **1.2.1. Digestão lipídica**

É possível manipular a composição dos AG nos tecidos dos animais monogástricos através da sua alimentação (McDonald et al. 2010). No entanto, em ruminantes a questão é mais delicada, nomeadamente, devido aos processos que ocorrem no rúmen que podem ter um impacto positivo ou negativo no produto final. Os lípidos quando entram no rúmen são transformados sob a ação de lipases de origem microbiana através de dois processos extremamente importantes: a lipólise e a BH (Jenkins et al. 2008).

Os tipos de lípidos integrantes na dieta que entram no rúmen são normalmente TG (mais comum), fosfolípidos e galactolípidos (Jenkins et al. 2008). Quando os TG são expostos ao meio ruminal, o alimento é imediatamente hidrolisado por lipases de origem

microbiana, causando assim a separação entre o ácido gordo e o glicerol, sendo o glicerol fermentado juntamente com outros açúcares a ácidos gordos voláteis (AGV), deixando os AG na sua forma livre (Jenkins 1994). Nesta etapa são também libertados os AG dos galactolípidos e dos fosfolípidos quando presentes na dieta por galactosidases e fosfolipases produzidas pela flora microbiana presente no rúmen (Jenkins 1994). A lipólise é um passo necessário para a ocorrência da BH uma vez que a hidrogenação dos AG só irá ocorrer se o grupo carboxílico estiver livre (Jenkins 1994 e Buccioni et al. 2012). Sem a ocorrência da lipólise no rúmen, os PUFA conseguem escapar à hidrogenação, e poderão ficar disponíveis para absorção no duodeno, no entanto a quantidade de PUFA que consegue chegar ao duodeno é relativamente pequena (Buccioni et al. 2012).

Depois do processo da lipólise ocorre o processo de BH. Este processo consiste na conversão dos PUFA em SFA (Jenkins, et al. 2008) através das bactérias ruminais que atuam em simbiose e que têm a capacidade de isomerizar e hidrogenar as duplas ligações dos PUFA. Este processo levado a cabo pelas bactérias, consiste num mecanismo de defesa contra os efeitos tóxicos dos UFA sobre as bactérias (Jenkins 1994; Buccioni et al. 2012 e Bessa et al. 2015) podendo ser inibido por diversos fatores tais como valores de pH inferiores a 6 ou a adição de antibióticos como ionóforos (Demeyer e Doreau 1999).

Os UFA mais comuns na dieta de um ruminante são o 18:1 $\omega$ 9, LA e ALA, assim, são estes AG que ficam mais sujeitos ao processo de saturação. Logo, o processo de BH leva maioritariamente à formação do 18:0 como produto final, bem como a diversos AG insaturados, maioritariamente *trans*, como produtos intermediários (Doreau et al. 2012). As formas incompletamente hidrogenadas ou apenas isomerizadas podem ser designadas por produtos intermédios ou "intermediários da BH (BI)" (Bessa 2019), registando-se em maior número o CLA $\omega$ 9 $\omega$ 11 (presente na BH do LA) e o 18:1 $\omega$ 11 comum à BH dos LA e ALA. O processo incompleto da BH leva a que umas quantidades significativas destes BI escapem à saturação completa e possam ser absorvidos e depositados nos tecidos dos ruminantes. É este o fenómeno responsável pelos baixos teores de PUFA, altos teores em SFA e variável quantidade em AG *trans* nos produtos provenientes dos ruminantes (Demeyer e Doreau 1999) tais como a carne ou o leite. Posto isto, a BH pode ser considerada um problema, pois pode causar impactos positivos ou negativos na qualidade nutricional do produto final que é originado desse animal.

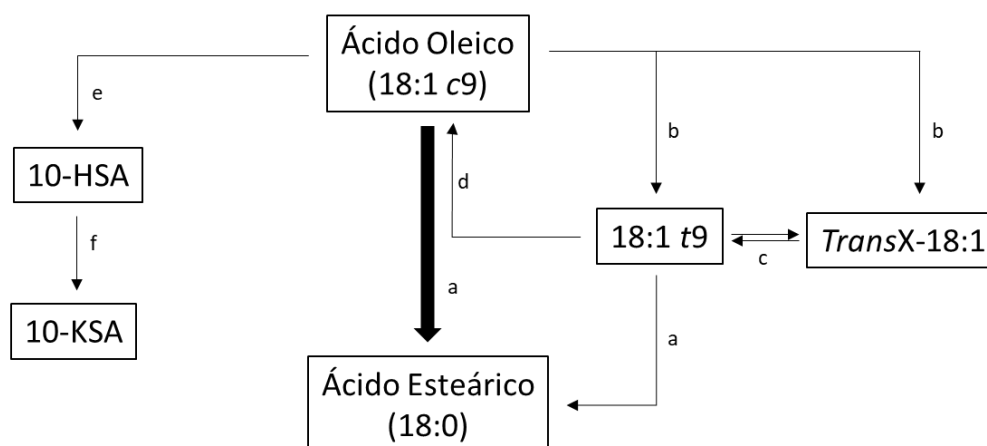
A solução para resolver este problema poderá passar pela proteção dos lípidos da dieta contra o ataque no rúmen, mas que permaneçam suscetíveis à hidrólise enzimática e absorção no intestino delgado (McDonald et al. 2010). Neste sentido, têm sido desenvolvidas diversas tecnologias de proteção dos lípidos com o objetivo de resolver este



indesejável assunto da BH (Gadeyne et al. 2016; Olloqui et al. 2018). No entanto, estas tecnologias ou são muito dispendiosas acabando por não compensar o seu uso, ou os produtos protegidos quando são efetivamente usados, não são totalmente eficazes.

#### 1.2.1.1. Bioidrogenação dos ácidos oleico, linoleico e linólenico

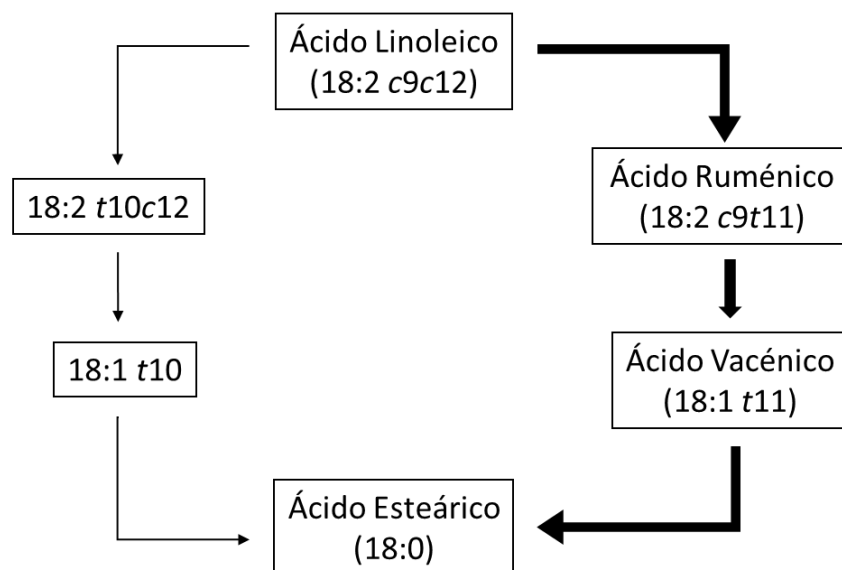
Têm-se registado progressos consideráveis no que diz respeito à identificação de intermediários formados na BH do ácido oleico, LA e ALA, no entanto, a identidade dos intermediários que surgem na BH dos *n*-3 LC-PUFA, incluindo a maioria dos AG provenientes dos óleos de peixe, permanece ainda muito superficial (Jenkins et al. 2008). O 18:1 *c*9 pode ser hidrogenado diretamente a 18:0 sem a formação de intermediários *trans* (Mosley et al. 2002). No entanto, vários estudos *in vitro* demonstram a possibilidade de se formarem *trans*-18:1 durante a BH do 18:1 *c*9 (Mosley et al. 2002). Jenkins (2006) propôs três vias de BH do 18:1 *c*9 (Figura 4). Uma das vias é a hidrogenação direta do 18:1 *c*9 para formar o 18:0. Outra via envolve a isomerização de uma posição *cis* para *trans*, permitindo a formação de múltiplos isómeros *trans*-18:1 com duplas ligações entre as posições C<sub>6</sub> e C<sub>16</sub>, existindo ainda a possibilidade de isomerização inversa com alguns 18:1 *t*9 convertidos em 18:1 *c*9. Já a terceira e última via, corresponde à hidratação do 18:1 *c*9 em ácido 10-hidroxi-esteárico que ao sofrer oxidação passa a denominar-se 10-ceto-esteárico (Jenkins et al. 2006a; 2008b; 2009c).



**Figura 4. Principais vias da bioidrogenação do ácido oleico (adaptado de Jenkins et al. 2006)**

As diferentes letras presentes na figura compreendem as diferentes reações; a) hidrogenação da dupla ligação para formar ácido esteárico; b) isomerização *cis-trans*; c) isomerização *trans-trans*; d) isomerização *trans-cis*; e) hidratação; f) oxidação. As linhas com maior espessura representam a via principal da bioidrogenação, as linhas com menor espessura apresentam outras vias alternativas.

Relativamente à BH do LA (Figura 5), sabe-se que a conversão do mesmo em 18:0 inclui dois intermediários: o CLAc9t11 e o 18:1t11. No entanto, sabe-se também que existem muitos mais *trans*-18:1 e isómeros de CLA (Jenkins et al. 2008). Na maior parte dos casos, o CLAc9t11 é o isómero mais abundante nos conteúdos ruminais (Jenkins et al. 2008). No entanto, determinadas condições ruminais associadas a modificações existentes na população microbiana levam a que a BH siga um caminho alternativo levando à produção de um outro isómero de CLA, o 18:2t10c12, que, após redução leva à acumulação de 18:1t10 (Griinari e Bauman 1999). Esta etapa é conhecida como o *shiftrans*-10 (Bessa et al. 2015). O aumento da produção de 18:1t10 no rúmen em detrimento do 18:1t11 faz com que este se acumule nos tecidos reduzindo assim a disponibilidade de substrato para a formação endógena de CLAc9t11, dado que este não é um precursor de isómeros de CLA (Bessa et al. 2015). A produção de 18:1t10 aumenta quando os ruminantes são alimentados a concentrados onde são adicionadas fontes de PUFA (Aldai et al. 2013). Contrariamente ao 18:1t10, o 18:1t11 é produzido no rúmen que, por via endógena, e com a ação da enzima  $\Delta$ -9-desaturase, origina novamente CLAc9t11 nos tecidos do animal.

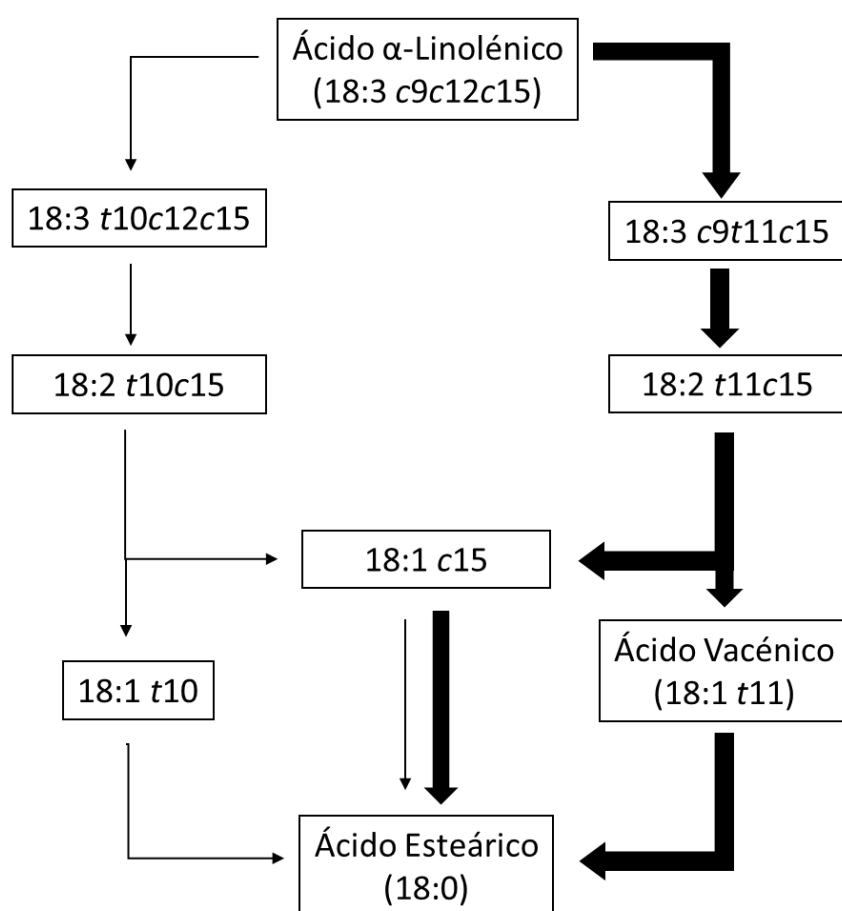


**Figura 5. Bioidrogenação simplificada do ácido linoleico (adaptado de Kramer et al. 2004).**

As linhas com maior espessura representam a via principal da bioidrogenação, as linhas com menor espessura apresentam outras vias alternativas.

A BH do ALA não tem sido investigada tão extensivamente como a dos ácidos oleico e linoleico (Jenkins et al. 2009). Segundo a maioria das publicações consultadas, o ALA é em primeiro lugar, convertido a 18:3c9t11c15 através da BH ruminal. Após este fenómeno, o

18:2 $\Delta$ 11 $\Delta$ 15 é produzido pela redução da dupla ligação *cis*-9, sendo posteriormente hidrogenado a 18:1 $\Delta$ 11 para produzir 18:0 como produto final da BH (Jenkins et al. 2009). No entanto, Lee et al. (2011) provou que uma quantidade importante de CLA e isômeros 18:3 podem também ser formados pela população microbiana. Griinari e Bauman (1999) previram a ocorrência de 18:3 $\Delta$ 10 $\Delta$ 12 $\Delta$ 15, 18:2 $\Delta$ 10 $\Delta$ 15 e 18:1 $\Delta$ 10 como intermediários da BH do ALA. Mais tarde, de acordo com os estudos de Alves e Bessa (2014), foi detectado pela primeira vez o 18:2 $\Delta$ 10 $\Delta$ 15 no rúmen, abomaso e amostras de carne de animais alimentados com concentrado suplementado com fontes de ALA, o que suporta a previsão feita anteriormente, sendo, desta forma, possível considerar duas principais vias de BH para o ALA (Figura 6).



**Figura 6. Principais vias da biohidrogenação do ácido linolênico (adaptado de Alves et al. 2014; Griinari et al. 1999).**

As linhas com maior espessura representam a via principal da biohidrogenação, as linhas com menor espessura apresentam outras vias alternativas.

### 1.2.1.2. Bioidrogenação dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

Se quando falamos da BH dos AG C18, só por si, já é complexo, quando falamos dos AG de cadeia longa (que contêm 20 a 24 carbonos), mais complexo se torna. Os AG de cadeia longa normalmente presentes na alimentação animal são os provenientes dos óleos de peixe e microalgas como os DPA, DHA e EPA, como analisado anteriormente. Toral et al. (2018) refere que a principal via que explica a BH, *in vitro*, do EPA e DPA parece prosseguir através da redução da ligação dupla mais próxima do grupo carboxílico, nomeadamente a ligação dupla *cis*-5 no EPA e *cis*-7 no DPA. Foram propostas por Aldai et al. (2018), duas vias para o início da BH do DHA: na primeira via ocorre uma isomerização *cis-trans* da dupla ligação do DHA com a finalidade de formar seis isómeros geométricos mono-*trans* metilenos interrompidos de DHA (MTMI-DHA), que após a migração da dupla ligação *trans* formarão intermediários mono-conjugados de DHA (MC-DHA) que serão posteriormente reduzidos a 22:5. A segunda via parece proceder por uma via de isomerases não identificadas que poderão explicar a formação preferencial de *c4,c7,c10,t14,c19-22:5* pela via do sistema conjugado "*t14,c16*". Estes resultados sugerem que a BH inicial do DHA é semelhante ao que acontece aos AG C18 (Aldai et al. 2018). Alves et al. (2018) também confirmou pela primeira vez, *in vitro*, que o EPA é sucessivamente hidrogenado de forma a obter como produto final 20:0.

Exposto isto, a BH destes AG de cadeia longa ainda está a ser discutida não havendo conclusões concretas que definam as suas vias de BH.

### 1.2.4. Absorção lipídica e transporte até aos tecidos

Uma vez que não existe uma absorção ou modificação significativa dos AG de cadeia media e longa no omaso e abomaso, a quantidade de material lipídico disponível para absorção no intestino delgado é semelhante à que escapa do rúmen (Lock et al. 2006). Este material lipídico corresponde, aproximadamente, de 80 a 90% de AG livres aderidos a partículas de alimentos e os componentes lipídicos que restam são fosfolípidos microbianos e pequenas quantidades de TG e glicolípidos da matéria prima remanescente que por sua vez, são hidrolisados por lípases intestinais e pancreáticas (Lock et al. 2006; Doreau e Ferlay 1994).

Concluída a BH, os AG continuam o seu caminho no trato digestivo para serem absorvidos na região do jejuno, situado no intestino delgado. Antes de chegar a esse compartimento, duas secreções, a biliar e o suco pancreático são adicionados à *digesta* no duodeno. A biliar fornece sais biliares e lecitina, já o suco pancreático, por sua vez,

providencia a formação de lisoleticina e bicarbonato que permitem aumentar o pH. A lisoleticina juntamente com os sais biliares, dissolve os AG das partículas dos alimentos e bactérias, permitindo a formação de micelas (Lock et al. 2006) que, devido à sua capacidade de solubilizar os AG insolúveis em água, faz com que a parte lipídica agarrada às partículas dos alimentos solubilize no meio aquoso (Lock et al. 2006). Depois de formadas as micelas, vão ser absorvidas pelas células epiteliais intestinais do jejuno (Demeyer e Doreau 1999). Finalmente, dentro das células epiteliais intestinais, os AG são novamente esterificados em TG e fosfolípidos sendo depois transportados para o sistema linfático pelas lipoproteínas (Lock et al. 2006).

As lipoproteínas do plasma transportam os lípidos de órgãos como o intestino e o fígado para os tecidos periféricos. Falamos de macromoléculas que contêm diferentes lípidos e proteínas especializadas solúveis nos fluidos dos sistemas vasculares e intestinais. Estas macromoléculas são denominadas como *quilomicrons*, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de intensidade intermédia (IDL), lipoproteínas de pequena densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) conforme a quantidade e densidade de AG presentes no seu interior (Bauchart 1993). Os *quilomicrons* e as VLDL transportam essencialmente TG enquanto que os fosfolípidos, colesterol e ésteres de colesterol são transportados maioritariamente pelas LDL e HDL (Bauchart 1993; Demeyer e Doreau, 1999). Em ovelhas, a presença de LC PUFA no intestino estimula a secreção de *quilomicrons* em comparação com os SFA que conduz à secreção de VLDL (Bauchart 1993; Hocquette e Bauchart 1999).

A composição e a taxa de secreção destas lipoproteínas são os principais fatores de controlo da utilização dos lípidos pelos tecidos e consequentemente das características quantitativas e qualitativas da produção de carne (Bauchart 1993).

#### **1.2.5. Deposição nos tecidos**

A primeira deposição de gordura formada é a gordura interna (abdominal, renal e pélvica), posteriormente a gordura intermuscular, subcutânea e por último a gordura intramuscular (Ladeira et al. 2016). A quantidade de gordura intramuscular e a sua composição em AG é responsável por uma quantidade de atributos qualitativos da carne, incluindo propriedades sensoriais e considerações saudáveis (Hocquette et al. 2010) sendo por essa razão, a de maior importância no que diz respeito à qualidade da carne. Para a deposição de gordura ocorrer, é necessário sintetizar os TG incorporados nos tecidos animais após a absorção dos AG da dieta ou após a síntese *de novo* de outros AG. A

lipogénese inclui dois importantes processos bioquímicos: a hidrólise dos lípidos transportados pelas lipoproteínas realizada pela lipoproteína lipase (cria um aumento local de concentração dos AG livres, o que aumenta a probabilidade de serem absorvidos pelos adipócitos), e através da síntese *de novo* a partir da glucose ou outros AGV produzidos no rúmen (de Oliveira 2017). Esta síntese *de novo* ocorre maioritariamente no tecido adiposo dos ruminantes enquanto nas aves, tal como nos humanos ocorre no fígado (Drackley 2000; Park et al. 2018). O principal substrato necessário para a síntese *de novo* nos ruminantes é o acetato produzido na fermentação que ocorre no rúmen (Park et al. 2018). O principal produto final da síntese *de novo* nos ruminantes é o 16:0, podendo este constituir 20 a 30% do total de AG presentes no tecido adiposo (Drackley 2000). No tecido adiposo, estão também presentes quantidades consideráveis de 18:0 e 18:1c9 que podem ter origem nos TG transportados pelas lipoproteínas ou serem produzidos através do 16:0 pela elongação e dessaturação da cadeia hidrocarbonada (de Oliveira 2017).

### **1.3. Fontes lipídicas na dieta de ruminantes**

Os ruminantes são animais fortemente dependentes das pastagens e forragens para as suas necessidades nutricionais (McDonald et al. 2010), forragens essas em proporções variáveis, de espécies diversas (gramíneas, leguminosas, em verde ou sob a forma de fenos ou silagens) com diferentes graus de maturidade e valor nutricional (de Oliveira 2017). A dieta de um ruminante contém entre 2-5% de lípidos (Doreau e Ferlay 1994) atingindo ocasionalmente valores mais altos que podem chegar aos 10% da MS ingerida. (Morand-Fehr e Tran 2001). Os lípidos são fontes importantes de energia, AGE, vitaminas lipossolúveis e pigmentos que conferem ao animal um papel nutricional essencial tendo também uma grande influência na qualidade organolética dos produtos provenientes dos mesmos como *flavour* e tenrura da carne bem como na qualidade da dieta (níveis de gordura, colesterol, SFA, PUFA e AGE) (Morand-Fehr e Tran 2001).

Os lípidos presentes na alimentação dos ruminantes em pastagem são predominantemente de origem foliar e são caracterizados pelo seu alto teor de glicolípidos e fosfolípidos (Harfoot 1981b). A composição em AG dos lípidos presentes nas plantas é dominada pela presença de uma grande quantidade de UFA, especialmente LA e ALA e acompanhado também com pequenas quantidades de 18:1c9 (Harfoot 1981b).

Dependendo do sistema de produção aplicado, a componente forrageira da dieta pode representar a totalidade do alimento disponível para os animais (sistemas extensivos) ou pode representar apenas uma parte de modo a garantir o funcionamento do rúmen (no

caso de sistemas mais intensivos), sendo necessário haver suplementação com outro tipo de alimentos (de Oliveira 2017).

### **1.3.1. Suplementação lipídica na dieta de borregos**

Os lípidos existentes nas folhas constituintes da dieta de um ruminante estão praticamente desprovidos de ácidos não esterificados e TG. Por esta razão, é comum suplementar os animais com alimentos de alto valor calórico (normalmente em sistemas mais intensivos), geralmente referidos como “concentrados”, que consistem essencialmente em grãos de cereais e sementes oleaginosas ou os seus extratos (óleos), com o objetivo de aumentar a quantidade de TG (Harfoot 1981b) sendo que a maioria destes produtos e subprodutos são processados visando facilitar a sua incorporação em concentrados, ou para prevenir o efeito negativo na ação da fibra na digestão do rúmen (Doreau e Ferlay 1994).

Como já referido anteriormente, é de grande interesse controlar o conteúdo lipídico presente na dieta dos animais, sendo necessário, em particular, aumentar a quantidade de PUFA como é o caso dos EPA, DHA e os seus precursores (AG da família *n*-3) (Morand-Fehr e Tran 2001). No entanto, com o problema da BH, apenas uma quantidade muito pequena destes AG (de importância redobrada) consegue chegar ao duodeno de forma a ser absorvido. Tendo em conta que estes são os principais AG gordos que queremos que passem, é importante encontrar uma solução para este problema. Atualmente, só é possível atingir uma elevada disponibilidade metabólica de *n*-3 LC-PUFA após a BH, recorrendo a tecnologias de encapsulação, infusão direta no abomaso ou suplementação com produtos de microalgas (Bessa et al. 2015).

### **1.3.2. Microalgas como suplemento lipídico**

As microalgas têm sido utilizadas por povos indígenas durante séculos, no entanto, a prática da cultura das mesmas tem apenas algumas décadas de estudo (Spolaore et al. 2006). Atualmente as microalgas têm diversas aplicações económicas (como biocombustíveis (Gouveia e Oliveira 2009) e alimentação humana (Gouveia et al. 2008)), incluindo a alimentação animal (Madeira et al. 2017).

Como abordado anteriormente, *n*-3 LC-PUFA como o EPA e o DHA são AG essenciais no que toca à saúde humana. Para além do pescado, existem outras fontes destes AG como bactérias, fungos, plantas e microalgas que são constantemente exploradas para fins comerciais. As microalgas são consideradas os produtores primários mais abundantes do meio aquático. Estes organismos convertem energia solar e dióxido de

carbono (através da fotossíntese) em biomassa como hidratos de carbono, proteínas, lípidos (principalmente TG), minerais e pigmentos como carotenoides e clorofilas (Hu et al. 2008; Adarme-Vega et al. 2012; Madeira et al. 2017). São organismos unicelulares em que a membrana plasmática é protegida por uma parede celular complexa que pode diferir bastante, apresentando grande diversidade entre espécies, estirpe e condições de crescimento (Alves et al. 2018). Os constituintes mais comuns presentes na parede celular destes organismos são polissacáridos, incluindo a celulose, lípidos e proteínas, no entanto, algumas microalgas são protegidas também por uma parede celular inorgânica rígida (Arnold et al. 2015).

O potencial das fontes de PUFA de origem marinha para alterar a composição de AG na carne bovina tem sido alvo de diversas investigações (Scollan et al. 2017). Várias empresas têm mudado o seu foco da produção de biodiesel (através das microalgas) para produção de produtos ricos em ómega 3 e proteína estabelecendo como objetivo, o fabrico destinado à alimentação animal (Adarme-Vega et al. 2012), não só na aquacultura, mas também na pecuária (Gouveia et al. 2008). Atualmente, cerca de 30% da produção global de algas tem como fim a alimentação animal (Gouveia et al. 2008). Já é possível encontrar ovos de galinha enriquecidos com DHA nos mercados (Bruneel et al. 2013) e leite de vaca enriquecido em *n*-3 LC-PUFA, sendo estes AG obtidos através da alimentação desses mesmos animais (De Jesus Raposo et al. 2013). Animais alimentados com microalgas também influencia positivamente a qualidade da carne de ovino, suíno e aves (nomeadamente galinhas) (Madeira et al. 2017). Enquanto que no caso dos ruminantes as microalgas podem ser adicionadas na dieta diretamente, em monogástricos é necessário o processamento da microalga antes da incorporação. Os ruminantes possuem a capacidade de digerir as paredes celulares das algas (os monogástricos não) sendo então, por isso que nestes últimos anos as microalgas têm revelado grande interesse no que diz respeito a alimentação destes animais com vista a enriquecer os seus produtos, nomeadamente a carne, em *n*-3 LC-PUFA (Madeira et al. 2017).

#### **1.3.2.1. Microalgas na alimentação de pequenos ruminantes**

Foram já realizados vários estudos sobre este tema (alimentação de ruminantes com dietas à base de microalgas), visando o enriquecimento dos seus produtos, o leite e a carne, em AG essenciais. No entanto, a maior parte destes estudos foram realizados com animais leiteiros, sendo que para animais produtores de carne, ainda existem poucos estudos.



No que diz respeito ao desempenho produtivo de borregos, Stokes et al. (2015), testou a digestibilidade de dietas à base de microalgas e sugeriu que estas podem ter um efeito positivo no crescimento dos animais. Nos estudos de Hopkins et al. (2014) e Meale et al. (2014), a incorporação de microalgas através de um óleo extraído rico em DHA (DHA-Gold) não teve efeitos no crescimento dos borregos. Inversamente, existem estudos onde houve redução do consumo quando incorporado DHA-Gold (Urrutia et al. 2016; Díaz et al. 2017; Francisco et al. 2019), o que provoca uma diminuição no ganho médio diário e consequentemente um maior período de deposição de gordura. Holman et al. (2012) conclui que a adição de 10% de biomassa de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) promove os pesos médios dos animais, enquanto uma adição de 20% não mostra resultados significativos. Já no estudo de Sucu et al. (2017), a suplementação com biomassa de microalga, nomeadamente *Schizochytrium limacinum*, na dieta de borregos melhora a sua produção. EL-Sabagh et al. (2014) também conclui que a biomassa de *Spirulina plantesis* pode ser incorporada na dieta de borregos de engorda como antioxidante, imuno-estimulante e promotor de crescimento. Coleman et al. (2018), por sua vez, conclui que borregos amamentados por progenitoras que receberam suplementação rica em EPA e DHA, não causa efeitos na performance nem no metabolismo dos mesmos. O mesmo foi proposto por (Moreno-Indias, Sánchez-Macías et al. 2012), sugerindo que pequenas concentrações de suplemento em DHA podem ser usadas em leites de substituição, desta vez para cabritos, sem efeitos negativos na qualidade da carne promovendo também efeitos positivos na saúde humana. Isto aumenta também a quantidade de DHA e melhora o rácio  $n-6/n-3$  da carne desses animais (Moreno-Indias, Morales-delaNuez et al. 2012).

No que diz respeito à qualidade da carne, dietas com incorporação de óleo extraído de microalgas ricas em DHA (como é o caso da *Schizochytrium spp.*) aumentam a qualidade da carne pelo aumento dos níveis de  $n-3$  LC-PUFA, nomeadamente o EPA e DHA e um decréscimo no rácio  $n-6/n-3$  em borregos (Hopkins et al. 2014; Meale et al. 2014; Urrutia et al. 2016; Díaz et al. 2017). No entanto, este tipo de dietas, pode alterar outras qualidades da carne como a cor e estabilidade oxidativa, o que, por sua vez, resulta na redução de outras características sensoriais da carne como o aumento de “Off Flavours” (Urrutia et al. 2016). De acordo com de la Fuente-Vázquez et al. (2014), dietas enriquecidas com 4% de biomassa desidratada de *Isochrysis spp.* fornecidas a borregos modificam a sua composição em AG de maneira positiva, aumentando o conteúdo em MUFA, CLA e alguns AG importantes  $n-3$  LC-PUFA como o EPA, DPA e DHA, sem afetar a composição química, cor e pH da carne.

Contudo, é possível verificar que a adição de microalgas na dieta de ruminantes depende de vários fatores, tais como, a diferente composição e quantidade de AG das

diferentes espécies de microalgas, e a quantidade de microalgas ou extratos da mesma incorporados na dieta, assim como o seu modo de administração. Assim sendo, revela-se então necessário mais estudos com animais de modo a ajudar a concluir que as microalgas poderão trazer maiores benefícios, tendo em conta os resultados produtivos bem como o fator económico. Para isso terá que se testar a viabilidade das microalgas ao incorporá-las nas dietas dos animais de forma a enriquecer nutricionalmente os produtos derivados desses animais e desta forma, continuar a ter um papel positivo tanto na performance e saúde do animal como também sob o ponto de vista do consumidor (relativamente às características sensoriais e nutricionais da carne).

As microalgas são, em geral, constituídas por paredes celulares rígidas o que poderá dificultar a biodisponibilidade dos seus componentes bioativos para os animais. Vários métodos mecânicos, químicos e biológicos têm sido estudados com vista à destruição da parede celular das microalgas de maneira a que se consiga extrair os seus valiosos componentes (incluindo os lípidos) (Lee et al. 2017). Uma das espécies de microalgas mais robustas e resistentes à destruição da parede celular, testado por diferentes métodos (Long e Abdelkader 2011; Schwede et al. 2011; McMillan et al. 2013), é a *Nannochloropsis spp.* Gunnison e Alexander (1975) testaram a resistência de algumas microalgas submetendo-as à decomposição microbiana tendo sido possível concluir, de forma clara, que algumas paredes celulares de microalgas apresentam resistência ao ataque microbiano, o que revela interesse ao nível da alimentação de ruminantes. Olloqui et al. (2018), por sua vez, utilizou alginato (proveniente de microalgas) num estudo *in vitro* de modo a proteger óleo de peixe contra o ataque microbiano existente no rúmen tendo concluído que ao usar alginato a 1% conseguia aumentar consideravelmente a disponibilidade de EPA e DHA nos conteúdos intestinais. Dada a resistência das paredes celulares das microalgas ao ataque microbiano, Alves et al. (2018) sugeriu que estas pudessem resistir aos microrganismos do rúmen, protegendo assim os PUFA nelas existentes contra a BH. De facto, está descrito que os *n*-3 LC-PUFA são extensamente hidrogenados no rúmen, onde 90% do DHA e EPA proveniente de óleo de peixe desprotegido não atinge o duodeno, no entanto, aqueles provenientes de algas são menos hidrogenados (Bessa et al. 2015). Alves et al. (2018) confirma, *in vitro*, que a metabolização do EPA no rúmen, utilizando a microalga *N. oceanica* é baixa comparativamente com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* e que se torna ainda mais baixa quando a microalga é sujeita ao método de secagem por liofilização.

Assim, este trabalho tem como objetivo testar a hipótese proposta por Alves et al. (2018), porém, desta vez, *in vivo*. Especificamente, pretende-se avaliar se a microalga *N. oceanica* poderá proteger naturalmente o EPA da metabolização no rúmen, mas que essa proteção poderá depender do método de secagem da biomassa. Irá assim ser avaliado se a

liofilização ou a secagem por atomização (*spray-drying*) afetará a quantidade de EPA transferida para a carne por comparação com um óleo rico em EPA extraído de *Nannochloropsis spp*, em que o grau de proteção do EPA será inferior. Pretende-se ainda avaliar se a incorporação da *N. oceanica* na dieta de borregos tem boa aceitabilidade e se não compromete o crescimento e a qualidade da carcaça por comparação com um grupo controlo, sem inclusão da microalga na dieta.

### 2.1. Materiais e métodos

#### 2.1.1. Maneio dos animais e abate

Vinte e oito borregos da raça Merino Branco (MB) de aproximadamente 60 dias de idade foram transportados até ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), localizada no Vale de Santarém, Portugal. À chegada, foram pesados tendo sido registada uma média de peso inicial de  $18,9 \pm 3,9$  kg. Os borregos foram depois aleatoriamente distribuídos por 28 parques individuais iniciando assim um período de adaptação com a duração de 8 dias, onde os animais foram desparasitados. Após este período de adaptação, seguiu-se um período de transição de 6 dias em que se começaram a introduzir progressivamente as dietas inerentes ao estudo. Foram distribuídas 4 dietas de forma totalmente aleatória considerando três grupos de animais com pesos homogêneos de média  $21,8 \pm 4,4$  kg. Foram administradas na forma de granulado onde a ração base, foi sempre a mesma (Tabela 7 em Anexo I) e à qual denominámos de controlo (C) não contendo qualquer fonte de EPA nem de vitamina E. As outras 3 dietas, consistiram na dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis* spp (O), 9,2% de *Nannochloropsis oceanica* liofilizada (L) e 12,3% de *Nannochloropsis oceanica* spray-dried (S). Cada porção de microalga foi adicionada para conter quantidades idênticas de EPA (3 g/kg de MS), adicionou-se ainda 1,67 g/kg MS de vitamina. A composição química da dieta encontra-se na Tabela 1. O ensaio teve a duração de 3 semanas, sendo oferecido diariamente às 9:00 da manhã 1,200 kg de dieta por animal durante as duas primeiras semanas, sendo este um valor que foi ajustado quanto à quantidade total de alimento que estava disponível e quanto aquilo que os animais poderiam comer. Na terceira e última semana de ensaio, fez-se *ad libitum*, de maneira a perceber se de facto, os animais tinham uma boa aceitabilidade. Os animais foram pesados semanalmente antes de lhes ser fornecida a dieta.

Depois de concluídas as três semanas de ensaio, os animais foram abatidos no matadouro experimental do INIAV-Santarém. Após o abate, foi registado o peso quente de cada carcaça, e estas posteriormente armazenadas numa câmara frigorífica a 2 °C. Quarenta e oito horas *pós-mortem* foram registados os pesos da carcaça fria. Fez-se a desmancha de cada carcaça onde foram colhidas amostras de músculo *longissimus dorsi* posteriormente armazenadas a -20 °C. Nesta fase, também foi medida a cor do músculo *longissimus dorsi* e da gordura subcutânea recorrendo ao colorímetro Minolta CR400

(Konica Minolta, Portugal), tendo sido registados os valores para L\* (luminosidade), a\* (vermelho) e b\* (amarelo) tendo sido registados.

**Tabela 1. Composição química (% de MS) e composição em ácidos gordos (g/100g) presentes nas diferentes dietas administradas aos animais.**

<b>Composição química</b>	<b>Dietas<sup>1</sup></b>			
	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>S</b>	<b>L</b>
Matéria seca	90,4	90,7	90,2	90,7
N-Total	3,05	2,93	3,30	3,37
PB	19,1	18,3	20,6	21,1
MGT	1,33	3,25	3,52	3,4
NDF	26,74	26,70	23,22	28,96
ADF	17,28	17,40	15,04	16,68
ADL	3,03	2,81	2,68	3,12
Açúcar	7,32	6,94	6,55	6,79
Amido	27,69	27,94	24,7	22,69
Cinza	8,46	8,99	11,41	9,08
<b>Ácidos gordos</b>				
C14:0	-	1.27	2.40	2.28
C16:0	25.45	23.04	23.86	26.11
C16:1c9	0.48	5.15	10.19	8.24
C17:0	0.64	0.32	-	-
C18:0	4.12	2.98	2.51	3.32
C18:1c9	18.64	14.45	11.81	13.73
C18:1c11	0.75	0.92	0.74	0.70
C18:2n-6	41.01	31.48	28.16	29.14
C20:0	-	-	-	-
C18:3n-3	8.91	6.79	5.00	6.43
C22:0	-	0.59	0.37	-
C20:4n-6	-	2.56	3.70	3.15
C20:5n-3	-	10.43	11.26	6.90

<sup>1</sup>C – Dieta Controlo sem qualquer fonte de EPA; O - Dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis spp*; S - Dieta C suplementada com 12,3% de *Nannochloropsis oceanica spray-dried*; L - Dieta C suplementada com 9,2% de *Nannochloropsis oceanica* liofilizada;

### 2.1.2. Análise Sensorial

Um painel sensorial de provadores da INIAV-Santarém, composto por 11 elementos avaliou as características sensoriais da carne ao longo de 4 sessões. Por cada sessão foram selecionados 4 lombos correspondendo cada um a cada dieta diferente aplicada no ensaio (C, O, S e L); foram depois postas a descongelar durante cerca de 24 horas. Após esse período, foi feita a desossa e os músculos *longíssimus dorsi* foram cozinhados num forno elétrico a 170 °C até à temperatura interna atingir 71 °C sendo esta, monitorizada por um termómetro (Thermometer, Eomega RDXL4SD, Manchester, USA). Cada exemplar foi cortado em pedaços de 1 x 1 x 1 cm que, por sua vez, foram mantidos aquecidos até ao momento de prova. A carne foi avaliada segundo uma escala numérica de 1 a 8, onde 8 corresponde a “extremamente agradável” e 1 corresponde a “extremamente desagradável”, sendo admitidos valores decimais segundo as características: Intensidade do odor a carne de borrego, Suculência, Tenrura, Intensidade do *flavour*, Aceitação do *flavour* e Aceitação global. Para os “Off Flavours” a avaliação foi feita apenas através dos valores 1 e 0, indicando sim e não, respetivamente. A ficha de prova de carne de borrego encontra-se no Anexo II.

### 2.1.3. Análises Laboratoriais

Para a quantificação dos lípidos e AG presentes no músculo, foram realizadas análises laboratoriais tais como a extração de lípidos, transesterificação para obtenção dos ácidos gordos na forma de ésteres metílicos e posterior análise por cromatografia gasosa.

#### 2.1.3.1. Extração de lípidos

Foi utilizado o método de Folch *et al* (1957) com as devidas adaptações do Laboratório de Sistemas de Produção Animal do CIISA-Faculdade de Medicina Veterinária (FMV, ULisboa). Para a realização da extração de lípidos pesou-se aproximadamente 200 mg (KernAEJ 100-4NM, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Alemanha) de cada amostra de músculo liofilizado e depositou-se em tubos de 16 mL. Adicionou-se 2 mL de metanol às amostras deixando-as a humedecer num período de 5 minutos, antes de serem colocadas num banho *ultrasons* (Elmasonic S 60H, Singen, Alemanha) a 30 °C durante 5 minutos. Concluída esta etapa, adicionaram-se 4 mL de diclorometano que depois de passarem pelo *vortex* (Heidolph Reax top, Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha), foram colocadas novamente no banho *ultrasons* durante 10 minutos à mesma temperatura do passo

anterior. Depois deste período, centrifugaram-se as amostras durante 5 minutos de forma a separar a fase sólida, depois retirou-se o máximo de solvente para um outro tubo de 16 mL. De seguida, adicionaram-se à fase sólida 6 mL de diclorometano:metanol (2:1), passou-se no vortex e voltaram a ser submetidos ao banho *ultrassons* (10 minutos) sendo posteriormente centrifugado (5 minutos) antes de ser retirado o solvente. Este passo foi repetido, desta vez com banho *ultrassons* durante 5 minutos. Concluída esta etapa, foi adicionado ao filtrado 3,6 ml de solução de cloreto de potássio a 0,88%, agitou-se e procedeu-se novamente à centrifugação (Centrifuga Astor 8 New, Poncarale, Itália) (durante 2 minutos). Retirou-se a parte inferior do filtrado para um balão *Erlenmeyer* de 50 mL previamente tarado, e levou-se ao evaporador rotativo (Heidolph Hei-Vap, Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) a 40°C. No final, colocaram-se as amostras 2 horas na estufa e 1 hora no exsiccador (sucessivamente) até peso constante.

#### **2.1.3.2. Transesterificação combinada**

Adicionou-se 1 mL de tolueno seco ao extrato lipídico deixando atuar durante breves minutos. Adicionou-se 1 mL e 3 mL de padrão interno (19:0, 1 mg/mL) e metóxido de sódio 0,5M em metanol, respetivamente. Agitou-se no *vortex* durante 10 segundos e colocou-se no banho de água (J.P. Selecta, Barcelona, Espanha) a 40 rpm e a 50°C durante 30 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente (15 a 20 minutos), adicionou-se 2 mL de HCl 1,25M em metanol e colocou-se no banho de água a 80°C com agitação de 40 rpm durante 15 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente (15 a 20 minutos), adicionou-se 2 mL em duas porções de 1 mL de solução aquosa 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Depois de concluído este passo, adicionaram-se 2 mL de n-hexano, agitou-se no *vortex*, centrifugou-se e recolheu-se o sobrenadante para outro tubo por sua vez, contendo aproximadamente 0,5 g de sulfato de sódio de anidro e tendo-se depois repetido novamente este passo colocando o sobrenadante no tubo utilizado anteriormente. Agitou-se posteriormente no *vórtex*, centrifugou-se (5 minutos) e transferiu-se o solvente para outro tubo. Finalmente, evaporou-se utilizando o evaporador de corrente de Azoto (Liebisch, Bielefeld, Alemanha) a 37°C e voltou-se a ressuspender a amostra em 1mL de n-hexano. Para terminar, transferiu-se para um vial e armazenou-se a -20 °C até posterior análise por cromatografia gasosa.

### 2.1.3.3. Análise por cromatografia gasosa

Os AG na forma de ésteres metílicos foram separados e quantificados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID). Para isso utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu 2010-Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida, SP-2560 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As condições do GC foram as seguintes: a temperatura do injetor e o detetor foram mantidos a 220 °C e 250 °C, respectivamente; utilizou-se hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0 mL/min e foi injetada 1 µL de amostra com um split ratio de 1:50. O forno foi programado para iniciar a uma temperatura de 50°C que foi mantida durante 1 min, seguidamente a temperatura subiu até aos 150°C a uma velocidade de 50 °C/min, e esta temperatura foi mantida durante 20 min, posteriormente a temperatura subiu até aos 190°C a uma velocidade de 1 °C/min, e por fim a temperatura subiu até aos 220 °C a uma velocidade de 2 °C/min onde foi mantida durante 118 min, perfazendo um tempo total de 118 min. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção com misturas de padrões disponíveis comercialmente, e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

### 2.1.4. Análise Estatística

O tratamento estatístico foi efetuado através do procedimento de modelos mistos “*proc mixed*” do programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) utilizando um único fator fixo, o tratamento, sendo a unidade experimental o parque. Para diferenças significativas no modelo, efetua-se teste de comparação múltipla (LSD, least square difference) e testa-se a heterogeneidade de variância. Quando justificável ajustam-se os modelos considerando a heterogeneidade de variância entre tratamentos. Consideram-se diferenças significativas quando  $P < 0,05$  ou tendências quando o  $P < 0,1$ .

Os dados da análise sensorial foram analisados com um modelo misto que inclui como efeitos fixos o tratamento e o provador e como efeito aleatório o efeito da sessão de prova. Para o caso da presença ou ausência de *Off flavors* (variável binária) os dados foram analisados com o “*proc glimix*” utilizando a distribuição binária e a transformação *Logit* como função de ligação (link function), sendo as probabilidades de ocorrência de *Off flavours* obtidas apresentadas em percentagem.



## 2.2. Resultados

### 2.2.1. Desempenho produtivo

De acordo com a Tabela 2, podemos verificar que tanto o consumo, como o crescimento e características de carcaça não foram afetados pelas dietas experimentais ( $P>0,05$ ) sendo que as dietas O, S e L têm valores semelhantes à dieta C. Relativamente ao rendimento em carcaça, as dietas L, S e O têm um rendimento de carcaça de 48,8 e 48,1% e 47,6%, respetivamente, sendo significativamente superior ( $P<0,05$ ) ao da dieta C de percentagem 46,3%. No entanto, a dieta O é considerada igual à dieta C.

**Tabela 2. Consumo, crescimento e características da carcaça de borregos alimentados com diferentes dietas.**

	Dietas <sup>1</sup>				EPM	p-value
	C	O	S	L		
<b>Consumo total</b> (kg de MS)	24,7	24,6	26	24,1	1,144	0,681
<b>Peso inicial</b> (kg)	21,8	21,1	22,9	21,2	1,786	0,881
<b>Peso final</b> (kg)	29,3	28,0	30,3	28,2	1,868	0,809
<b>GMD</b> (g/d)	338	314	336	319	17,11	0,701
<b>IC</b> (kg/kg de MS)	3,33	3,58	3,58	3,48	0,219	0,789
<b>PCQ</b> (kg)	13,6	13,3	14,6	14,2	0,920	0,736
<b>PCF</b> (kg)	13,1	12,8	14,1	13,2	0,914	0,775
<b>Enxugo</b> (%)	3,9	3,8	3,9	3,7	0,186	0,799
<b>Rendimento em carcaça</b> (%)	46,3 <sup>b</sup>	47,6 <sup>ab</sup>	48,1 <sup>a</sup>	48,8 <sup>a</sup>	0,590	0,047
<b>Perda de peso na cozedura</b> (%)	27,3	28,0	26,0	25,5	0,014	0,596

Valores na mesma linha com diferentes letras (a e b) são significativamente diferentes ( $P<0,05$ ).

GMD (ganho médio diário), IC (índice de conversão), PCQ (peso de carcaça quente), PCF (peso de carcaça), EPM (erro padrão da média).

<sup>1</sup>C – Dieta Controlo sem qualquer fonte de EPA; O - Dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis spp*; S - Dieta C suplementada com 12,3% de *Nannochloropsis oceanica spray-dried*; L - Dieta C suplementada com 9,2% de *N. oceanica* liofilizada;

### 2.2.2. Cor e Análise Sensorial

Relativamente aos valores estabelecidos para a cor da carne (Tabela 3), não foram registadas diferenças significativas com o efeito das dietas ( $P>0,05$ ). No entanto, relativamente aos valores médios registados para a gordura as dietas afetaram os valores de  $b^*$  ( $P<0,05$ ), sendo que a dieta S foi a que apresentou um valor de média superior (10,2) relativamente às restantes dietas, embora a dieta L seja igual à dieta S e C.

**Tabela 3. Avaliação da cor da carne (músculo *longissimus dorsi*) e da gordura subcutânea de borregos alimentados com diferentes dietas.**

		Dietas <sup>1</sup>				EPM	p-value
		C	O	S	L		
Carne	L*	45.1	45.2	44.7	44.8	0.8953	0.9689
	a*	13.9	14.9	14.8	14.9	0.5583	0.5687
	b*	10.2	9.87	9.85	10.1	0.2759	0.7083
Gordura	L*	74.5	73.8	74.7	73.8	1.2408	0.9333
	a*	4.77	4.62	4.84	3.55	0.7905	0.6338
	b*	7.79 <sup>bc</sup>	7.37 <sup>c</sup>	10.2 <sup>a</sup>	9.26 <sup>ab</sup>	0.7056	0.0304

Valores na mesma linha com diferentes letras (a, b e c) são significativamente diferentes ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup>C – Dieta Controlo sem qualquer fonte de EPA; O - Dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis* spp; S - Dieta C suplementada com 12,3% de *Nannochloropsis oceanica* spray-dried; L - Dieta C suplementada com 9,2% de *N. oceanica* liofilizada;

Na análise sensorial (Tabela 4), as dietas que contêm microalgas na sua incorporação (O, S e L) não afetaram significativamente as características sensoriais da carne ( $P>0,05$ ) comparativamente com a dieta C. As características sensoriais da carne “Odor a Borrego”, “Tenrura”, “*Flavour*”, “Suculência”, “Aceitação do *Flavour*” e “Aceitação global” foram avaliadas em média nos valores de  $3,9 \pm 0,08$ ,  $6,5 \pm 0,16$ ,  $4,2 \pm 0,1$ ,  $5,5 \pm 0,2$ ,  $6 \pm 0,14$  e  $6,1 \pm 0,12$ , respetivamente. Na avaliação dos “Off *Flavours*”, as dietas afetaram significativamente esta característica ( $P<0,05$ ). Este impacto manifestou-se mais na dieta L, comparativamente com as restantes, com uma média de  $0,14 \pm 3,27$ , sendo esta dieta a que foi classificada com mais avaliações positivas do que negativas para esta característica (Off *Flavours*).

**Tabela 4. Classificação das diferentes características sensoriais, por um painel de provadores, da carne de borregos alimentados com diferentes dietas.**

		Dietas <sup>1</sup>				EPM	p-value
		C	O	S	L		
<b>Odor</b>	<b>a</b>	3,91	3,76	3,96	3,96	0,149	0,749
<b>borrego</b>							
<b>Tenrura</b>		6,26	6,72	6,50	6,45	0,168	0,164
<b>Flavour</b>		4,28	4,05	4,08	4,23	0,208	0,604
<b>Suculência</b>		5,24	5,58	5,70	5,45	0,224	0,163
<b>Aceitação do flavour</b>		6,01	6,08	6,05	5,72	0,144	0,188
<b>Off Flavours</b>		0* <sup>ab</sup>	0,009 <sup>b</sup> ±2,1	0,019 <sup>b</sup> ±4,43	0,14 <sup>a</sup> ±3,27		0.019
<b>Aceitação global</b>		5,99	6,23	6,18	5,95	0,118	0,228

Valores na mesma linha com diferentes letras (a e b) são significativamente diferentes (P<0.05).

<sup>1</sup>C – Dieta Controlo sem qualquer fonte de EPA; O - Dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis spp*; S - Dieta C suplementada com 12,3% de *Nannochloropsis oceanica spray dried*; L - Dieta C suplementada com 9,2% de *N. oceanica* liofilizada;

\*1,57x10<sup>-10</sup> ±1,23x10<sup>-7</sup>

### 2.2.3. Composição em ácidos gordos

O teor de lípidos totais (Tabela 4) não foi afetado pela dieta (P>0,05), apresentando um valor médio de 73,95 ± 0,93 mg/g de MS de carne. O teor de AG totais (AGT) também não foi afetado pelas dietas (P>0,05), tendo uma média de 49,6 ± 2,15 mg/g de MS de carne. Os AG com maior abundância nas amostras analisadas foram o 18:1c9, 16:0, 18:0 e o 18:2n-6 com valores médios de 29,3 ±1,76, 23,1 ±0,46, 14,5 ±0,55 e 8,7 ±0,28 %, respetivamente.

**Tabela 5. Concentração de Lípidos Totais (LT) em mg/g de MS de carne, ácidos gordos totais (AGT) em mg/g de MS de carne e a composição em ácidos gordos em % do total de ácidos gordos presentes na carne de borregos alimentados com diferentes dietas.**

		Dietas <sup>1</sup>				EPM	p-value
		C	O	S	L		
<b>LT</b>		73,3	74,6	72,8	75,1	3,640	0,966
<b>Total AGT</b>		50,8	52,1	48,9	46,4	3,129	0,610
<b>12:0</b>		0,25	0,26	0,27	0,25	0,025	0,906
<b>14:0</b>		2,65	2,83	2,97	2,85	0,201	0,741
<b>i-15:0</b>		0,06	0,05	0,07	0,06	0,007	0,221
<b>a-15:0</b>		0,11	0,09	0,11	0,09	0,008	0,427
<b>14:1c9</b>		0,07	0,08	0,08	0,07	0,009	0,847

<b>15:0</b>	0,34	0,33	0,36	0,37	0,016	0,321
<b>i-16:0</b>	0,12 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>c</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,10 <sup>bc</sup>	0,008	0,013
<b>16:0</b>	22,3	23,3	23,4	23,4	0,474	0,327
<b>16:1<i>t</i>9</b>	0,07	0,12	0,14	0,15	0,029	0,244
<b>i-17:0</b>	0,26	0,25	0,31	0,29	0,017	0,076
<b>16:1<i>c</i>7</b>	0,31	0,27	0,32	0,29	0,016	0,182
<b>16:1<i>c</i>9</b>	1,25 <sup>b</sup>	1,39 <sup>b</sup>	1,62 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup>	0,071	<0,001
<b>a-17:0</b>	0,35 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,022	0,025
<b>17:0</b>	1,06	1,03	0,93	1,01	0,050	0,285
<b>i-18:0</b>	0,11 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,005	0,007
<b>17:1<i>c</i>9</b>	0,59 <sup>a</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,47 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,028	0,013
<b>18:0</b>	15,4 <sup>a</sup>	14,4 <sup>b</sup>	14,3 <sup>b</sup>	13,9 <sup>b</sup>	0,317	0,013
<b>18:1<i>t</i>6<i>t</i>7<i>t</i>8</b>	0,21	0,20	0,22	0,20	0,014	0,752
<b>18:1<i>t</i>9</b>	0,21	0,25	0,28	0,27	0,017	0,071
<b>18:1<i>t</i>10</b>	1,64	1,28	0,83	0,99	0,230	0,090
<b>18:1<i>t</i>11</b>	1,12 <sup>b</sup> ±0,096	1,63 <sup>ab</sup> ±0,533	1,93 <sup>a</sup> ±0,233	1,80 <sup>a</sup> ±0,266		0,008
<b>18:1<i>t</i>12</b>	0,31 <sup>b</sup>	0,30 <sup>b</sup>	0,40 <sup>a</sup>	0,36 <sup>ab</sup>	0,027	0,042
<b>18:1<i>c</i>9</b>	31,3 <sup>a</sup>	30,8 <sup>a</sup>	27,7 <sup>b</sup>	27,4 <sup>b</sup>	0,840	0,004
<b>18:1<i>t</i>15</b>	0,08 <sup>b</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,014	0,019
<b>18:1<i>c</i>11</b>	1,58	1,56	1,61	1,87	0,100	0,121
<b>18:1<i>c</i>12</b>	0,27 <sup>ab</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,029	0,023
<b>18:1<i>c</i>13</b>	0,09 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,006	<0,001
<b>18:1<i>t</i>16/<i>c</i>14</b>	0,12	0,12	0,15	0,13	0,013	0,401
<b>18:1<i>c</i>15</b>	0,06	0,07	0,07	0,06	0,010	0,918
<b>18:2<i>c</i>9<i>t</i>13/<i>c</i>9<i>t</i>14/<i>c</i>iclo-17</b>	0,23	0,25	0,27	0,26	0,022	0,649
<b>18:2<i>c</i>9<i>t</i>15</b>	0,11	0,11	0,12	0,11	0,010	0,587
<b>18:2<i>c</i>9<i>t</i>12</b>	0,04	0,05	0,05	0,05	0,004	0,545
<b>18:1<i>c</i>16</b>	0,07 <sup>ab</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,009	0,009
<b>18:2<i>t</i>9<i>c</i>12</b>	0,07±0,006	0,09±0,019	0,15±0,034	0,13±0,032		0,138
<b>18:2<i>t</i>11<i>c</i>15</b>	0,20	0,29	0,20	0,25	0,029	0,142
<b>18:2<i>n</i>-6</b>	8,58	8,24	8,87	8,95	0,572	0,814
<b>19:1-1</b>	0,06	0,05	0,05	0,05	0,005	0,205
<b>18:2<i>c</i>9<i>c</i>15</b>	0,07	0,05	0,05	0,05	0,007	0,203
<b>18:2<i>c</i>12<i>c</i>15</b>	0,04 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,009	0,038
<b>20:0</b>	0,11	0,10	0,14	0,11	0,014	0,216
<b>18:3<i>n</i>-6</b>	0,10 <sup>a</sup>	0,07 <sup>c</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	0,005	0,001
<b>18:3<i>n</i>-3<sup>2</sup></b>	0,96	0,98	0,97	0,99	0,045	0,956
<b>CLAc9<i>t</i>11</b>	0,54	0,62	0,70	0,71	0,074	0,329
<b>20:2<i>n</i>-6</b>	0,09 <sup>b</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,009	0,036
<b>18:3<i>c</i>9<i>t</i>11<i>c</i>13<sup>3</sup></b>	0,45	0,34	0,43	0,32	0,041	0,098
<b>20:3<i>n</i>-6</b>	0,31 <sup>b</sup>	0,40 <sup>ab</sup>	0,43 <sup>a</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,033	0,012
<b>20:3<i>n</i>-3</b>	0,03 <sup>c</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,14 <sup>b</sup>	0,017	<0,001
<b>20:4<i>n</i>-6</b>	3,14	2,8	3,49	3,45	0,257	0,228

<b>23:0</b>	0,13	0,13	0,16	0,14	0,020	0,719
<b>20:4n-3</b>	0,05 <sup>c</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,22 <sup>ab</sup>	0,032	<0,001
<b>20:5n-3</b>	0,67 <sup>c</sup>	1,15 <sup>b</sup>	1,6 <sup>ab</sup>	1,88 <sup>a</sup>	0,154	<0,001
<b>22:4n-6</b>	0,22 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,017	0,005
<b>22:5n-3</b>	1,03 <sup>b</sup> ±0,066	1,21 <sup>b</sup> ±0,055	1,64 <sup>a</sup> ±0,099	1,73 <sup>a</sup> ±0,215		0,001
<b>22:6n-3</b>	0,34	0,39	0,49	0,41	0,050	0,260

Valores na mesma linha com diferentes letras (a e b) são significativamente diferentes (P<0,05).

<sup>1</sup>C – Dieta Controlo sem qualquer fonte de EPA; O - Dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis spp*; S - Dieta C suplementada com 12,3% de *Nannochloropsis oceanica spray dried*; L - Dieta C suplementada com 9,2% de *N. oceanica* liofilizada;

<sup>2</sup>pode conter 20:1

<sup>3</sup>pode conter 20:3n-9

Num total de 54 AG detetados nas amostras, 23 apresentaram diferenças significativas entre dietas. As dietas causaram efeitos significativos para o 16:1c9, apresentando valores mais altos para as dietas L e S e valores mais baixos para as dietas O e C (P<0,05). Para o 18:0, as dietas tiveram um efeito significativo (P<0,05), observando-se valores maiores na dieta C e quantidades menores nas dietas O, S e L. Já no 18:1c9, também houve diferenças significativas (P<0,05) onde as maiores percentagens observadas foram nas dietas C e O comparativamente com as dietas S e L. No total de *trans*-18:1 (Tabela 6), não houve diferenças significativas (P>0,05), no entanto, quando observados individualmente (Tabela 5), muitos dos *trans*-18:1 mostraram diferenças significativas entre dietas. O AG em maior proporção no total de *trans*-18:1 foi o 18:1t11, com percentagens maiores nas dietas L, S e O, no entanto, a dieta O mostra ter resultados iguais aos da dieta C. Não houve efeitos significativos entre dietas para o 18:1t10, embora a percentagem tenha sido tendencialmente maior para a dieta C, comparativamente com as restantes (P=0,09). Já para o CLAc9t11 as dietas não causaram efeitos significativos (P>0,05).

Quanto aos LC-PUFA, num total de 10 AG detetados, 7 apresentaram diferenças significativas entre dietas. Diferenças significativas foram observadas para os LC-PUFA 20:2n-6 e 20:3n-6 (P<0,05), onde as quantidades destes AG foram maiores com a administração das dietas L, S e O, comparativamente com a dieta C, embora a dieta O seja igual a C. Para o 20:3n-3, houve também diferenças significativas entre dietas (P<0,05), havendo maiores quantidades na dieta O comparativamente às restantes, contudo, as dietas L e S são diferentes de C. O 20:4n-3 apresentou diferenças significativas (P<0,05) entre dietas, onde nas dietas O e L foi onde se observaram quantidades maiores comparativamente às restantes dietas, no entanto a dieta L é igual à dieta S. Os resultados para o 20:5n-3 (EPA) são significativos (P<0,05), sendo nas dietas L e S onde se manifestam percentagens mais elevadas (1,88 e 1,6%, respetivamente), embora a dieta S seja igual à dieta O. Para o 22:4n-6, os resultados foram significativamente diferentes (P<0,05) observando-se maiores quantidades nas dietas O, S e L, embora S tenha sido

igual à dieta C. Por último, para o 22:5n-3, houve também efeitos significativos entre dietas ( $P<0,05$ ), apresentando uma maior percentagem nas dietas L e S, comparativamente com as dietas O e C.

**Tabela 6. Total de AG *n*-3, *n*-6, *trans* -18:1 e BI presentes nas amostras de carne analisadas provenientes de borregos alimentados com diferentes dietas.**

	Dietas <sup>1</sup>				EPM	p-value
	C	O	S	L		
<b>Total de <i>n</i>-3</b>	3,08 <sup>c</sup>	4,23 <sup>b</sup>	5,02 <sup>a</sup>	5,38 <sup>a</sup>	0,326	<0,001
<b>Total de <i>n</i>-6</b>	12,5	11,7	13,2	13,2	0,841	0,559
<b><i>n</i>-6/<i>n</i>-3</b>	4,2 <sup>a</sup> ±0,39	2,8 <sup>b</sup> ±0,14	2,6 <sup>b</sup> ±0,12	2,5 <sup>b</sup> ±0,08		<0,001
<b><i>trans</i>-18:1</b>	3,70	3,87	3,82	4,01	0,351	0,940
<b>BI<sup>2</sup></b>	5,95	6,13	6,40	6,35	0,409	0,857

Valores na mesma linha com diferentes letras (a, b e c) são significativamente diferentes ( $p<0,05$ ).

<sup>1</sup>C – Dieta Controlo sem qualquer fonte de EPA; O - Dieta C suplementada com 1,2% de óleo extraído de *Nannochloropsis* spp; S - Dieta C suplementada com 12,3% de *Nannochloropsis oceanica* spray dried; L - Dieta C suplementada com 9,2% de *N. oceanica* liofilizada;

<sup>2</sup>intermediários da bioidrogenação

Na Tabela 6 estão apresentados os somatórios dos AG *n*-3, *n*-6, *trans*-18:1 e BI assim como o rácio *n*-6/*n*-3 para as diferentes dietas. As dietas causaram efeitos significativos no total de *n*-3 PUFA ( $P<0,05$ ), sendo que nas dietas L e S, foi onde se verificaram maiores percentagens (5,38 e 5,02 %, respetivamente) e cujos AG que contribuem para esse valor são o EPA e o DPA (Tabela 4). Quanto ao rácio *n*-6/*n*-3, observaram-se efeitos significativos ( $P<0,05$ ) entre dietas, sendo nas dietas O, S e L, as que apresentam valores mais baixos para este rácio comparativamente com a dieta C. Relativamente aos totais de AG *n*-6, *trans*-18:1 e BI, as dietas não tiveram efeitos significativos ( $P>0,05$ ).

## 2.3. Discussão

### 2.3.1. Desempenho produtivo

Ao observarmos os resultados referentes ao desempenho produtivo, podemos afirmar que este não foi afetado ao introduzir tanto a *Nannochloropsis oceanica* (dietas L e S) como o óleo extraído de uma *Nannochloropsis spp.* (O) na sua alimentação diária comparativamente com a dieta controlo, o que vai de encontro com os estudos feitos, em 2014, por Hopkins e Meale, no que diz respeito à incorporação de óleos ricos em DHA-Gold e Holman et al. (2012), relativamente à incorporação de biomassa de *Spirulina (Arthrospira platensis)*. Contrariamente, no estudo de Urrutia et al. (2016) a incorporação de DHA-Gold, diminuiu o consumo por parte dos animais, provocando também valores baixos no ganho médio diário (GMD). Embora os resultados sejam contraditórios, os mesmos sugerem que, de uma forma geral, as dietas para o presente estudo foram equilibradas ao nível da energia e proteína, conjugadas com uma quantidade de EPA de 3 g/kg de MS. No entanto, estes resultados podem ter por base o tipo de microalga utilizada, bem como a forma e quantidade em que as mesmas foram incorporadas.

Contrariamente a estudos já realizados (Hopkins et al. 2014; Meale et al. 2014), que referem não haver diferenças significativas nas carcaças dos animais, no presente estudo, verificou-se uma percentagem maior no rendimento de carcaça nas dietas suplementadas com microalgas, apesar de a dieta suplementada com o óleo ter apresentado resultados semelhantes à dieta controlo. Tendo em conta que o rendimento de carcaça se encontra inversamente proporcional ao peso vivo do animal, quer isto dizer que o rendimento de carcaça sendo ele maior, o peso vivo será menor. Isto pode estar relacionado com a quantidade de alimento presente no trato digestivo, que era assim menor, dando um total de peso vivo mais baixo. Facto este que poderá ser justificado pela ingestão de água que os borregos demonstraram durante o ensaio, provocando assim uma digestão mais rápida do alimento fazendo com que este permanecesse menos tempo no rúmen. A grande ingestão de água poderá dever-se à percentagem de sódio presente na microalga (Anexo III).

Posto isto, a incorporação equilibrada de microalgas nas dietas pode, de facto, ser efetuada sem que haja algum efeito negativo no desempenho produtivo dos animais.

### 2.3.2. Cor e Análise Sensorial

Nos resultados registados relativamente à cor da carne, não se observaram diferenças significativas, sugerindo os mesmos, uma vez mais, que a incorporação de microalgas, desde que incorporada nas devidas quantidades (nas dietas), não tem qualquer efeito negativo. Relativamente à gordura subcutânea, registaram-se diferenças significativas, nomeadamente, na dieta S, na variável  $b^*$ , cujo valor de 10,2 foi superior (quando comparado com as três restantes dietas), resultando numa cor de gordura mais amarelada. De acordo com Troy e Kerry (2010), o tecido adiposo é o tecido do animal onde se reflete mais a ingestão de pigmentos da dieta. Tendo em conta que as microalgas são organismos que têm uma quantidade importante de pigmentos (carotenoides e clorofilas) (Madeira et al. 2017), os resultados obtidos eram espectáveis. Apesar de se ter usado a mesma microalga nas dietas S e L, a dieta S, como referido anteriormente, foi a que manifestou o valor de  $b^*$  mais alto o que poderá dever-se ao facto de a *N. oceanica* incorporada na dieta S, ter sido seca por um método diferente (*spray dried*) da dieta L (liofilização) deixando esses pigmentos mais disponíveis para absorção. No entanto, este método de secagem pode afetar consideravelmente a qualidade da microalga, sobretudo na quantidade de carotenoides, que pode diminuir (DOE (U.S. Department of Energy) 2016). No entanto, é importante serem efetuados mais estudos relativos a métodos de secagem das microalgas para incorporação em dietas para animais.

Relativamente aos registos da Análise Sensorial, a avaliação feita pelo painel de provadores, sugere que, de uma forma geral, a carne de borrego cumpre com as seguintes características: “Intensidade do odor a carne de borrego”, “Suculência”, “Tenrura”, “Intensidade do *flavour*”, e “Aceitação do *flavour*”, não havendo diferenças significativas para nenhum destes indicadores. As características enumeradas anteriormente, foram classificadas com valores iguais ou superiores a 4, o que significa que a avaliação da carne pelo painel de provadores é, no mínimo, “ligeiramente agradável”. No entanto, a característica “Off *Flavours*”, como registado anteriormente (nos resultados), foi afetada pelas diferentes dietas, tendo sobressaído a dieta L. No trabalho de Urrutia et al. (2016), onde se utilizou DHA-Gold, também foram detetados “Off *Flavours*”, por, quase metade (48,9%), do painel de provadores, sendo que 13,6% identificaram essa característica como “*flavour* a peixe”. Este acontecimento, segundo Wood et al. (2003), pode estar relacionado com a oxidação térmica dos AG quando cozinhados, levando à produção de compostos voláteis e odoríferos, sendo que os UFA dos fosfolípidos da gordura intramuscular são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de *flavours*.



A aceitação global foi, no entanto, classificada com valores superiores a 4, o que significa que de uma forma geral, a carne dos animais (neste caso de ovino) submetidos às diferentes dietas, tem potencial para ser aceite pela população, tendo em conta os parâmetros associados às características sensoriais da carne (Anexo II).

### 2.3.3. Composição em ácidos gordos

Os principais AG presentes na carne, são o 18:1 $\omega$ 9, o 16:0, o 18:0 e, em menores quantidades, o LA e o ALA. Tendo em conta que os principais SFA representam quase 40% e que o principal MUFA representa aproximadamente 30% do total de AG da carne, estes resultados vão de encontro ao referido por Wood et al. (2007), querendo isto dizer que a incorporação da *N. oceanica* na dieta não afeta, de um modo geral, a quantidade destes AG presente na carne. No entanto, para o 18:0 e para o 18:1 $\omega$ 9 registaram-se diferenças significativas com a incorporação das diferentes dietas, registando-se na dieta C uma maior quantidade de ambos os AG. A incorporação de óleos marinhos quando na presença de PUFAS C18, resulta na acumulação de *trans*-18:1 no rúmen, provocando a inibição do último passo redutor das vias de BH ruminal, o que leva a uma redução na produção de 18:0 (Bessa et al. 2015). Uma vez que a quantidade de AG C18 presente nas dietas representava aproximadamente 50% do total de AG (Tabela 1), é expectável a formação de uma maior quantidade de *trans*-18:1 e menor quantidade de 18:0 nas dietas O, S e L comparativamente com a dieta C. Desta forma, verificou-se uma maior percentagem de 18:0 presente na dieta C comparativamente com as dietas O, S e L, assim como a acumulação de *trans*-18:1, evidente para as dietas O, S e L comparativamente com a dieta C. O mesmo já não se verifica para o 18:1 $\omega$ 10, onde se registou uma maior tendência para a dieta C (ainda que não significativa), comparativamente com as restantes dietas. Este resultado revelou-se positivo, visto que a ingestão de 18:1 $\omega$ 10 está associada a um maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo este um dos principais AG *trans* que queremos evitar na carne.

Como analisado anteriormente, o 18:1 $\omega$ 11 é o AG que mais contribuiu para o total de *trans*-18:1. É considerada desejável uma maior quantidade de ácido vacénico, uma vez que este serve de substrato para a formação de CLAc9 $\omega$ 11 nos tecidos, contribuindo positivamente para a saúde humana (Aldai et al. 2013). No entanto, (como registado nos resultados), não houve efeitos significativos entre dietas para o CLAc9 $\omega$ 11.

As diferentes percentagens de LC-PUFA na carne poderão dever-se à BH destes AG, sendo que, atualmente, pouco se sabe acerca do assunto, além da possibilidade dos

primeiros passos da BI do DHA *in vitro*, o que sugere um desfecho semelhante ao que acontece com os C18 (Aldai et al. 2018), isto é, uma primeira isomerização seguida de reduções. Outra possível explicação poderá ser a dessaturação e alongação enzimática a partir dos precursores LA e ALA, para a formação de *n*-6 LC-PUFA e *n*-3 LC-PUFA, respetivamente, uma vez que os ácidos 18:2*n*-6 e 18:3*n*-3 se encontram em quantidades relevantes na dieta fornecida aos animais (Tabela 1).

Quanto à quantidade de EPA presente na carne, observou-se uma maior quantidade nas dietas L, S e O comparativamente com a dieta C, sendo que as dietas S e L apresentam percentagens superiores. A dieta O foi utilizada como controlo positivo, e sendo esta composta por um óleo extraído de uma microalga, supõe-se que os AG (nomeadamente o EPA) estejam menos protegidos contra o ataque da população microbiana existente no rúmen. Isto permite uma melhor comparação entre as fontes de EPA (O, S e L), reforçando o papel protetor que as paredes celulares das microalgas têm sobre o EPA quando este passa pelo rúmen. Sendo assim, foi observada uma percentagem mais baixa de EPA na dieta O, comparativamente com as dietas S e L, devido a este AG estar, provavelmente, menos protegido. Quanto às dietas S e L, com o EPA presumivelmente mais protegido, apresentaram percentagens maiores deste AG. Porém, os resultados comprovam que a *N. oceanica* protegeu naturalmente o EPA da BH ruminal, como testado anteriormente em resultados *in vitro* (Alves et al. 2018), possibilitando que o EPA permanecesse disponível no intestino delgado, para posterior absorção. Embora não tenham ocorrido diferenças significativas na carne, quando utilizadas as microalgas *N. oceanica* liofilizada e *spray dried*, resultados recentes (Vitor et al. 2019) sobre a quantidade de EPA no rúmen deste mesmo ensaio, verificam uma maior quantidade de EPA quando utilizada a *N. oceanica* liofilizada, comparativamente com a *N. oceanica spray dried* e o óleo extraído de uma *Nannochloropsis spp.* Verificando os resultados do presente estudo em comparação com o anterior, supõe-se que podem ter ocorrido perdas de EPA durante o trajeto no trato gastrointestinal, ou que, o EPA poderá ter sido incorporado noutros tecidos para além do músculo.

Relativamente ao total de *n*-3 LC-PUFA, a inclusão de *N. oceanica* nas dietas causou efeitos significativos, levando a uma maior percentagem nas dietas S e L. Relativamente ao rácio *n*-6/*n*-3, os resultados mostram que a incorporação da *N. oceanica*, diminuiu esse valor, o que vem de encontro aos resultados anteriormente divulgados (Hopkins et al. 2014; Meale et al. 2014; Urrutia et al. 2016; Díaz et al. 2017) no que diz respeito à incorporação de microalgas em dietas de borregos.

Como já referido anteriormente, as recomendações diárias do somatório de EPA e DHA para um adulto, devem ser iguais ou superiores a 250 mg/dia. Ao estimarmos a

quantidade desse somatório na carne de borregos alimentados com a dieta L, dá o valor de 27 mg/ 100 g de carne. Significa isto então que um adulto teria de consumir cerca de 1 kg de carne por dia para suprir essas necessidades.

### 3. Considerações Finais

---

A incorporação da microalga *N. oceanica* em dietas de borregos resultou no aumento do total de *n*-3 LC PUFA, contribuindo em maior percentagem o EPA, seguido do DPA e DHA. Verificaram-se aumentos ao nível do AG 18:1 $\omega$ 11 e uma diminuição tendencial no 18:1 $\omega$ 10, comparativamente com a dieta controlo. É também relevante salientar que estes resultados foram alcançados sem afetar o desempenho produtivo dos animais, características da carcaça e qualidade da carne no que toca à avaliação da cor e das características sensoriais avaliadas para este estudo. Conclui-se também que as diferenças entre os métodos de secagem da biomassa das microalgas, de uma maneira geral, não foram significativas, registando-se sempre semelhanças entre os valores das dietas L e S. Este fator sugere que não será necessário um tratamento específico para se incorporar a biomassa da microalga na dieta.

A estratégia de adicionar a biomassa da microalga *N. oceanica* (dietas S e L) como fonte natural de proteção de EPA na dieta de borregos, resultou num aumento deste AG na carne desses animais, quando comparada com as dietas O (suplementada com óleo extraído de *Nannochloropsis spp.*) e Controlo, o que se revelou muito positivo. No entanto, tomando em atenção as recomendações propostas pelas organizações mundiais de saúde, para um adulto as alcançar teria de comer cerca de 1 kg de carne por dia, o que não é viável, no entanto poderá ajudar na contribuição para o aumento do EPA juntamente com outros alimentos.

Será agora interessante dar continuidade ao estudo. Uma vez que o EPA não se manifestou totalmente na carne, perceber se houve a manifestação do mesmo noutros tecidos mais nobres (por exemplo, cérebro ou olhos), que naturalmente contêm maior concentração de PUFA.

#### 4. Referências

---

- Adarme-Vega TC, Lim DKY, Timmins M, Vernen F, Li Y, Schenk PM. 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb Cell Fact*. 11:1–10. doi:10.1186/1475-2859-11-96.
- Aldai N, Delmonte P, Alves SP, Bessa RJB, Kramer JKG. 2018. Evidence for the initial steps of DHA biohydrogenation by mixed ruminal microorganisms from sheep involves formation of conjugated fatty acids. *J Agric Food Chem*. 66(4):842–855. doi:10.1021/acs.jafc.7b04563.
- Aldai N, de Renobales M, Barron LJR, Kramer JKG. 2013. What are the trans fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced trans fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements. *Eur J Lipid Sci Technol*. 115(12):1378–1401. doi:10.1002/ejlt.201300072.
- Alves SP, Bessa RJB. 2014. The trans-10,cis-15 18:2: A missing intermediate of trans-10 shifted rumen biohydrogenation pathway? *Lipids*. 49(6):527–541. doi:10.1007/s11745-014-3897-4.
- Alves SP, Mendonça SH, Silva JL, Bessa RJB. 2018. *Nannochloropsis oceanica*, a novel natural source of rumen-protected eicosapentaenoic acid (EPA) for ruminants. *Sci Rep*. 8(1):2–11. doi:10.1038/s41598-018-28576-7.
- Arnold AA, Genard B, Zito F, Tremblay R, Warschawski DE, Marcotte I. 2015. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by <sup>13</sup>C solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1848(1):369–377. doi:10.1016/j.bbamem.2014.07.017.
- Bauchart D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *J Dairy Sci*. 76(12):3864–3881. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77728-0.
- Bessa RJB. 2019. Lipid Animal. A metabolização dos ácidos gordos polinsaturados no rúmen. [accessed 2019 May 15]. <http://lipidanimal.fmv.utl.pt/index.php/pt/dossiers/150-bioidrogenacao>.
- Bessa RJB, Alves SP, Santos-Silva J. 2015. Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *Eur J Lipid Sci Technol*. 117(9):1325–1344. doi:10.1002/ejlt.201400468.
- Bruneel C, Lemahieu C, Fraeye I, Ryckebosch E, Muylaert K, Buyse J, Foubert I. 2013. Impact of microalgal feed supplementation on omega-3 fatty acid enrichment of hen eggs. *J Funct Foods*. 5(2):897–904. doi:10.1016/j.jff.2013.01.039.
- Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim Feed Sci Technol*. 174(1–2):1–25. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.02.009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.02.009>.
- Calnan H, Jacob RH, Pethick DW, Gardner GE. 2016. Production factors influence fresh lamb longissimus colour more than muscle traits such as myoglobin concentration and pH. *Meat Sci*. 119:41–50. doi:10.1016/j.meatsci.2016.04.009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.009>.
- Colby L, Garnier J-P, Eckley J. 2016. World sheep meat market to 2025. Warwickshire: AHDB Beef & Lamb and the International Meat Secretariat. [www.meat-ims.org](http://www.meat-ims.org).
- Coleman DN, Rivera-Acevedo KC, Relling AE. 2018. Prepartum fatty acid supplementation

- in sheep i. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation do not modify ewe and lamb metabolic status and performance through weaning. *J Anim Sci.* 96(1):364–374. doi:10.1093/jas/skx012.
- Demeyer D, Doreau M. 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc Nutr Soc.* 58(3):593–607. doi:10.1017/S0029665199000786.
- Díaz MT, Pérez C, Sánchez CI, Lauzurica S, Cañeque V, González C, De La Fuente J. 2017. Feeding microalgae increases omega 3 fatty acids of fat deposits and muscles in light lambs. *J Food Compos Anal.* 56:115–123. doi:10.1016/j.jfca.2016.12.009.
- DOE (U.S. Department of Energy). 2016. National algal biofuels technology review. Barry A, Wolfe A, English C, Ruddick C, Lambert D, editors. bioenergy.energy.gov for.
- Doreau M, Ferlay A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim Feed Sci Technol.* 45(3–4):379–396. doi:10.1016/0377-8401(94)90039-6.
- Doreau M, Fievez V, Troegeler-Meynadier A, Glasser F. 2012. Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant: Le point des connaissances récentes. *Prod Anim.* 25(4):361–374.
- Drackley JK. 2000. Lipid metabolism. In: D'Mello JPF, editor. *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. UK: CABI Publishing. p. 97–120.
- EL-Sabagh MR, Abd Eldaim MA, Mahboub DH, Abdel-Daim M. 2014. Effects of *spirulina platensis* algae on growth performance, antioxidative status and blood metabolites in fattening lambs. *J Agric Sci.* 6(3):92–98. doi:10.5539/jas.v6n3p92.
- FAO. 2010. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. Vol. 91.
- FAO. 2019. FAOSTAT. [accessed 2019 Sep 12]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Francisco A, Alves SP, Santos-Silva J, Bessa RJB. 2019. The effect os *Schizochytrium sp.* lipid extract or fish oil on lamb meat fatty acids. In: EAAP - 70th Annual Meeting. Ghent. p. 328.
- Gadeyne F, De Neve N, Vlaeminck B, Fievez V. 2016. State of the art in rumen lipid protection technologies and emerging interfacial protein cross-linking methods. *Eur J Lipid Sci Technol.* 118(5):1–22. doi:10.1002/ejlt.201600345.
- Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF, Culioli J. 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod Nutr Dev.* 41(1):1–26. doi:10.1051/rnd:2001108.
- Givens DL. 2015. Manipulation of lipids in animal-derived foods: Can it contribute to public health nutrition? *Eur J Lipid Sci Technol.* 117(9):1306–1316. doi:10.1002/ejlt.201400427.
- Gouveia L, Batista AP, Sousa I, Raymundo A, Bandarra NM. 2008. Microalgae in novel food products. In: Konstantinos N. Papadopoulos P, editor. *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc. p. 36.
- Gouveia L, Oliveira AC. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(2):269–274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6.
- Griinari JM, Bauman DE. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. *Adv Conjug Linoleic Acid Res Vol 1*:180–200. <http://www.cabdirect.org.ezproxy.library.wisc.edu/abstracts/19991415717.html?freeview=true%5Cnhttp://webpages.icav.up.pt/PTDC/CVT/122245/2010/03.pdf>.

- Gunnison D, Alexander M. 1975. Basis for the susceptibility of several algae to microbial decomposition. *Can J Microbiol.* 21(6):619–628. doi:10.1139/m75-089.
- Harfoot CG. 1981a. Anatomy, physiology and microbiology and microbiology of the ruminant digestive tract. In: Christie WW, editor. *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Ayr, Scotland: Pergamon. p. 1–19.
- Harfoot CG. 1981b. Lipid metabolism in the rumen. In: Christie w. w., editor. *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Ayr, Scotland: Pergamon. p. 21–55.
- Hocquette JF, Bauchart D. 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod Nutr Dev.* 39(1):27–48. doi:10.1051/rnd:19990102.
- Hocquette JF, Gondret F, Baza E, Mdale F, Jurie C, Pethick DW. 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: Development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal.* 4(2):303–319. doi:10.1017/S1751731109991091.
- Holman BWB, Kashani A, Malau-Aduli AEO. 2012. Growth and body conformation responses of genetically divergent Australian sheep to *spirulina (arthrospira platensis)* supplementation. *Am J Exp Agric.* 2(2):160–173. doi:10.9734/ajea/2012/992.
- Hopkins DL, Clayton EH, Lamb TA, Van de Ven RJ, Refshauge G, Kerr MJ, Bailes K, Lewandowski P, Ponnampalam EN. 2014. The impact of supplementing lambs with algae on growth, meat traits and oxidative status. *Meat Sci.* 98(2):135–141. doi:10.1016/j.meatsci.2014.05.016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.016>.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J.* 54(4):621–639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.
- Hunt MC, King A, Barbut S, Clause J, Cornforth D, Hanson D, Lindahl G, Mancini R, Milkowski A, Mohan A. 2012. AMSA meat color measurement guidelines. Illinois.
- Instituto Nacional de Estatística. 2017. Estatísticas Agrícolas 2017. 2018th ed. Instituto Nacional de Estatística IP, editor. Lisboa. [www.ine.pt](http://www.ine.pt).
- Jenkins TC. 1994. Regulation of lipid metabolism in the rumen. *J Nutr.* 124(suppl\_8):1372S–1376S. doi:10.1093/jn/124.suppl\_8.1372s. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77727-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9).
- Jenkins TC, AbuGhazaleh AA, Freeman S, Thies EJ. 2006. The production of 10-hydroxystearic and 10-ketostearic acids is an alternative route of oleic acid transformation by the ruminal microbiota in cattle. *J Nutr.* 136(4):926–931. doi:10.1093/jn/136.4.926.
- Jenkins TC, Klein CM, Lee YJ. 2009. New insights on the pathways of lipid biohydrogenation in the rumen with possible implications on animal performance. *Proc 24th Annu Southwest Nutr Manag Conf.*:90–105. [http://animal.cals.arizona.edu/swnmc/Proceedings/2009/10Jenkins\\_09.pdf](http://animal.cals.arizona.edu/swnmc/Proceedings/2009/10Jenkins_09.pdf).
- Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. 2008. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 86(2):397–412. doi:10.2527/jas.2007-0588.
- De Jesus Raposo MF, De Morais RMSC, De Morais AMMB. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.* 93(15):479–486. doi:10.1016/j.lfs.2013.08.002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>.

- Kramer JKG, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, Dugan MER. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am J Clin Nutr.* 79(6 Suppl). doi:10.1093/ajcn/79.6.1137s.
- de la Fuente-Vázquez J, Díaz-Díaz-Chirón MT, Pérez-Marcos C, Cañeque-Martínez V, Sánchez-González CI, Álvarez-Acero I, Fernández-Bermejo C, Rivas-Cañedo A, Lauzurica-Gómez S. 2014. Linseed, microalgae or fish oil dietary supplementation affects performance and quality characteristics of light lambs. *Spanish J Agric Res.* 12(2):436–447. doi:10.5424/sjar/2014122-4639.
- Ladeira MM, Schoonmaker JP, Gionbelli MP, Dias JCO, Gionbelli TRS, Carvalho JRR, Teixeira PD. 2016. Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. *Int J Mol Sci.* 17(6):1–21. doi:10.3390/ijms17060918.
- Lebret B, Picard B. 2015. Les principales composantes de la qualité des carcasses et des viandes dans les différentes espèces animales. *Prod Anim.* 28(2):93–98.
- Lee SY, Cho JM, Chang YK, Oh YK. 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresour Technol.* 244:1317–1328. doi:10.1016/j.biortech.2017.06.038. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>.
- Lee Y-J, Jenkins TC. 2011. Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *J Nutr.* 141(8):1445–1450. doi:10.3945/jn.111.138396.
- Lock AL, Harvatine KJ, Drackley JK, Bauman DE. 2006. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. *Proc Intermt Nutr Conf.*(January 2015):85–100. [http://www.ansci.cornell.edu/bauman/cia/conference\\_proceedings/articles/2006\\_Lock\\_et\\_al\\_InMtNC.pdf](http://www.ansci.cornell.edu/bauman/cia/conference_proceedings/articles/2006_Lock_et_al_InMtNC.pdf).
- Locke R, O'Connor J. 2017. Sheepmeat's unique global position. Meat & Livestock Australia Limited. [mla.com.au](http://mla.com.au).
- Long RD, Abdelkader E. 2011. Mixed-polarity azeotropic solvents for efficient extraction of lipids from nannochloropsis microalgae. *Am J Biochem Biotechnol.* 7(2):70–73. doi:10.3844/ajbbbsp.2011.70.73.
- Madeira MS, Cardoso C, Lopes PA, Coelho D, Afonso C, Bandarra NM, Prates JAM. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livest Sci.* 205(August):111–121. doi:10.1016/j.livsci.2017.09.020.
- Martins DA, Custódio L, Barreira L, Pereira H, Ben-hamadou R, Varela J, Abu-salah KM. 2013. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. *Mar Drugs.* 11:2259–2281. doi:10.3390/md11072259.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. 2010. *Animal nutrition.* Seventh Ed. Pearson.
- McMillan JR, Watson IA, Ali M, Jaafar W. 2013. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Appl Energy.* 103:128–134. doi:10.1016/j.apenergy.2012.09.020.
- Meale SJ, Chaves A V., He ML, McAllister TA. 2014. Dose-response of supplementing marine algae (*Schizochytrium spp.*) on production performance, fatty acid profiles, and wool parameters of growing lambs. *J Anim Sci.* 92(5):2202–2213. doi:10.2527/jas.2013-7024.
- Morand-Fehr P, Tran G. 2001. La fraction lipidique des aliments et les corps gras utilisés en alimentation animale. *Prod Anim.* 14(5):285–302.



- Moreno-Indias I., Morales-de la Nuez A, Hernández-Castellano LE, Sánchez-Macías D, Capote J, Castro N, Argüello A. 2012. Docosahexaenoic acid in the goat kid diet: effects on immune system and meat quality. *J Anim Sci.* 90:3729–3738. doi:10.2527/jas2011-4351.
- Moreno-Indias Isabel, Sánchez-Macías D, Martínez-de la Puente J, Morales-de la Nuez A, Hernández-Castellano LE, Castro N, Argüello A. 2012. The effect of diet and DHA addition on the sensory quality of goat kid meat. *Meat Sci.* 90(2):393–397. doi:10.1016/j.meatsci.2011.08.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.08.004>.
- Mosley EE, Powell GL, Riley MB, Jenkins TC. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. *J Lipid Res.* 43(2):290–296.
- de Oliveira MASP. 2017. Estratégias nutricionais na modulação da bioidrogenação ruminal com vista à melhoria do perfil de ácidos gordos da carne de ruminantes. Universidade de Lisboa.
- Ollouqui EJ, Castañeda-Ovando A, Contreras-López E, Hernandez-Sanchez D, Tapia-Maruri D, Piloni-Martini J, Añorve-Morga J. 2018. Encapsulation of fish oil into low-cost alginate beads and EPA-DHA release in a rumino-intestinal in vitro digestion model. *Eur J Lipid Sci Technol.* 120(9):1–9. doi:10.1002/ejlt.201800036.
- Park SJ, Beak SH, Jung DJS, Kim SY, Jeong IH, Piao MY, Kang HJ, Fassah DM, Na SW, Yoo SP, et al. 2018. Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle - A review. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 31(7):1043–1061. doi:10.5713/ajas.18.0310.
- Robinson JG, Stone NJ. 2006. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 98(4 SUPPL. 1):39–49. doi:10.1385/1-59745-095-2:39.
- SAC, Industry Strategy Consulting, INRA, Aragón DG de. 2000. An evaluation of the common organisation of the markets in the sheep and goat meat sector. Appendix to final report. :148–204. [http://ec.europa.eu/agriculture/eval/reports/sheep/ann\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/eval/reports/sheep/ann_en.pdf).
- Sañudo C, Sanchez A, Alfonso M. 1998. Small ruminant production systems and factors affecting lamb meat quality. *Meat Sci.* 49(SUPPL. 1):1993–1994. doi:10.1016/s0309-1740(98)90037-7.
- Schwede S, Kowalczyk A, Gerber M, Span R. 2011. Influence of different cell disruption techniques on mono digestion of algal biomass. *Bioenergy Technol World Renew Energy Congr 2011* 8-13 May, Linköping, Sweden. 57:41–47. doi:10.3384/ecp1105741.
- Scollan N, Hocquette JF, Nuernberg K, Dannenberger D, Richardson I, Moloney A. 2006. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.* 74(1):17–33. doi:10.1016/j.meatsci.2006.05.002.
- Scollan ND, Price EM, Morgan SA, Huws SA, Shingfield KJ. 2017. Can we improve the nutritional quality of meat? *Proc Nutr Soc.* 76(4):603–618. doi:10.1017/S0029665117001112.
- De Smet S, Raes K, Demeyer D. 2004. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim Res.* 53(INRA, EDP Sciences):81–98. doi:10.1051/animres:2004003.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 101(2):87–96. doi:10.1263/jbb.101.87.
- Stokes RS, Van Emon ML, Loy DD, Hansen SL. 2015. Assessment of algae meal as a

- ruminant feedstuff: Nutrient digestibility in sheep as a model species. *J Anim Sci.* 93(11):5386–5394. doi:10.2527/jas.2015-9583.
- Sucu E, Udum D, Günes N, Canbolat önder, Filya I. 2017. Influence of supplementing diet with microalgae (*Schizochytrium limacinum*) on growth and metabolism in lambs during the summer. *Turkish J Vet Anim Sci.* 41(2):167–174. doi:10.3906/vet-1606-65.
- Toral PG, Hervás G, Leskinen H, Shingfield KJ, Frutos P. 2018. In vitro ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic (EPA), docosapentaenoic (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in cows and ewes: Intermediate metabolites and pathways. *J Dairy Sci.* 101(7):6109–6121. doi:10.3168/jds.2017-14183. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-14183>.
- Troy DJ, Kerry JP. 2010. Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Sci.* 86:214–226. doi:10.1016/j.meatsci.2010.05.009.
- Urrutia O, Mendizabal JA, Insausti K, Soret B, Purroy A, Arana A. 2016. Effects of addition of linseed and marine algae to the diet on adipose tissue development, fatty acid profile, lipogenic gene expression, and meat quality in lambs. *PLoS One.* 11(6):1–23. doi:10.1371/journal.pone.0156765. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156765>.
- Vitor AC, Godinho AM, Alves SP, Huws S, Bessa RJB. 2019. New strategies for the protection of polyunsaturated fatty acids from the rumen microbiome: *Nannochloropsis oceanica* as a natural source of rumen-protected EPA. In: 17th Euro Fed Lipid Congress and Expo. Oils, Fats and Lipids: Driving science and technology to new horizons. 20-23 October 2019; Sevilha, Espanha. p. 222.
- Williamson CS, Foster RK, Stanner SA, Buttriss JL. 2005. Review: Red meat in the diet. *Nutr Bull.* 30(1):323–355. doi:10.1111/j.1467-3010.2010.01871.x.
- Wood JD, Enser M, Richardson RI, Whittington FM. 2007. Fatty acids in meat and meat products.
- Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher A V, Campo MM, Kasapidou E, Sheard PR, Enser M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 66:21–32. doi:10.1016/S0309-1740(03)00022-6.

## 5. Anexo I

---

**Tabela 7. Composição da dieta base (Controlo) utilizada na mistura com as diferentes fontes de EPA.**

<b>Ingredientes</b>	<b>(%)</b>
Cevada	39,0
Bagaço de Soja	17,0
Luzerna (granulado)	40,0
Carbonato de Cálcio	1,3
Bicarbonato de sódio	2,0
Sal Marinho	0,4
Vitatec Cordeiros	0,3

## 6. Anexo II

### PAINEL DE ANÁLISE SENSORIAL FICHA DE PROVA DE CARNE DE BORREGO



Prorador: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Notas: Vão ser apresentadas quatro amostras de lombo de borrego provenientes de diferentes condições de alimentação dos animais.  
Deverá atribuir uma pontuação entre 1,0 e 8,0, de acordo com a tabela em baixo, sendo permitido valores decimais (exemplo: 1,0; 5,4; 5,5; 7,7)  
Solicitamos que **não atribua a mesma pontuação a amostras distintas**.  
Obrigado e Boa prova.

#### Avaliação ao abrir a placa de petri

Atributo / Amostras	A	B	C	D
Intensidade do odor a carne de borrego				
Odores estranhos (Sim / Não)				

Se detectou odores estranhos consegue identificar ? \_\_\_\_\_

#### Avaliação durante a mastigação

Atributo / Amostras	A	B	C	D
Suculência				
Tenrura				
Intensidade de <i>flavour</i> a carne de borrego				
Aceitação do <i>flavour</i>				
Aceitação global				

#### Descrição dos atributos e respetiva escala

Suculência	Tenrura	Intensidade odor / <i>flavour</i>	Aceitação <i>flavour</i> /global
1. Extremamente SECO	1. Extremamente DURO	1. Extremamente SUAVE	1. Extremamente INACEITÁVEL
2. Muito Seco	2. Muito duro	2. Muito suave	2. Muito inaceitável
3. Moderadamente Seco	3. Moderadamente duro	3. Moderadamente suave	3. Moderadamente inaceitável
4. Ligeiramente Seco	4. Ligeiramente duro	4. Ligeiramente suave	4. Ligeiramente inaceitável
5. Ligeiramente suculento	5. Ligeiramente Tenro	5. Ligeiramente intenso	5. Ligeiramente aceitável
6. Moderadamente suculento	6. Moderadamente Tenro	6. Moderadamente intenso	6. Moderadamente aceitável
7. Muito suculento	7. Muito Tenro	7. Muito intenso	7. Muito aceitável
8. Extremamente SUCULENTO	8. Extremamente TENRO	8. Extremamente INTENSO	8. Extremamente ACEITÁVEL

## 7. Anexo III



**Allmicroalgae**  
natural products

### Certificate of Analysis

#### Product Specifications

Type:	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Origin:	Algafarm, Portugal
Production:	Closed system	Processing:	Gently spray dried powder
Production Date:	January 2019	Expiration Date:	January 2022

Lot 201940028

#### Analysis Results

	Results	Units	Methodology
<b>Nutrients</b>			
Total Lipids	13,6	g/100g	Soxhlet
Protein	32,3	g/100g	Kjeldahl
Ash	12,3	g/100g	Burning at 525°C
Moisture	3,5	g/100g	Drying at 105°C
Sodium	8,0	g/100g	Digestion / AAS
<b>Fatty Acids</b>			
EPA (% of Lipids)	29,1	%	Extraction / GC-FID
<b>Pigments</b>			
Chlorophyll	2361	mg/100g	Extraction / HPLC
Total Carotenoids	521	mg/100g	Extraction / HPLC
<b>Microbiological Specifications</b>			
Aerobic Plate total counts 30°C	8,5x10 <sup>3</sup>	cfu/g	ISO 4833:2003 ISO 4833-1:2013
<i>E. coli</i>	Not Detected		ISO 16649-2:2001
<i>Vibrio</i> spp.	Neg. 25g		ISO/TS 21872-2:2007
Yeasts	<1x10 <sup>1</sup>	cfu/g	ISO 21527-2:2008
Moulds	<1x10 <sup>1</sup>	cfu/g	ISO 21527-2:2008
<b>Heavy Metals</b>			
Lead	0,34	mg/kg	Digestion / AAS
Cadmium	0,10	mg/kg	Digestion / AAS
Mercury	<0,10	mg/kg	Digestion / AAS
Arsenic	0,25	mg/kg	Digestion / AAS
Tin	<2,00	mg/kg	Digestion / GC

Pataias, 18-02-2019

*Joana*

Quality Assurance

*Joana Laranjeira Silva*

Technical Manager



Allmicroalgae - Nature Products SA. Avenida das Forças Armadas, 125; 1600 Lisboa, Portugal; Ph: +351 217927100; E-mail: info@allmicroalgae.com